

Universidad de Santiago de Compostela
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina

**LA VITAMINA D REGULA LA
EXPRESIÓN DEL FACTOR
NEUROTROFICO GDNF EN CULTIVOS
NEURONALES ESTRIATALES Y EN
RATAS NORMALES Y
HEMIPARKINSONIANAS**



Begoña Sánchez Rey
Julio 2006

Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

**LA VITAMINA D REGULA LA EXPRESIÓN DEL
FACTOR NEUROTROFICO GDNF EN CULTIVOS
NEURONALES ESTRIATALES Y EN RATAS NORMALES
Y HEMIPARKINSONIANAS**

TESIS DOCTORAL

Begoña Sánchez Rey

Santiago de Compostela

Julio 2006

D. Román Pérez-Fernández y D. José Luis Relova Quinteiro, Profesores Titulares del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN QUE:

Dña. Begoña Sánchez Rey ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología el trabajo de su tesis doctoral, ***La Vitamina D regula la expresión del factor neurotrófico GDNF en cultivos neuronales estriatales y en ratas normales y hemiparkinsonianas***, y que una vez finalizado, reúne los requisitos necesarios para ser presentado y valorado ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expiden y firman en Santiago de Compostela, a Julio del 2006.

Prof. Román Pérez Fernández

Prof. José Luis Relova Quinteiro

*A mis abuelos, José y Josefina,
por vuestra generosidad,
pero fundamentalmente,
por vuestro cariño.
A vosotros va dedicada especialmente.*

*A mis padres, Camilo y María,
por vuestro apoyo, confianza, comprensión
y por animarme a seguir adelante.*

*A mis grandes amigas, Carmen,
por ser como eres, un ejemplo de persona,
y a Nieves,
por escucharme siempre que lo necesité y
“soportarme” desde el instituto.*

*Por último, y no menos importante,
a mi pequeñín “Gusi”,
por los buenos momentos
que me hizo... y espero, me seguirá haciendo pasar
durante muchos años.*

AGRADECIMIENTOS

Como dice el refrán *“De bien nacido es ser agradecido”*, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han trabajado en el Departamento de Fisiología, Ciencias Morfológicas y Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, y sin cuyo apoyo y colaboración no podría haber realizado este trabajo, entre las que destacaré:

Al Profesor Román Pérez Fernández, director de esta tesis, por permitirme realizar este trabajo y tener un acercamiento al mundo de la ciencia que sin duda dejará una gran huella.

Al Prof. José Luis Relova, por ayudarme generosamente en el diseño experimental y en la estereotaxia de los animales, y por poner a mi disposición su experiencia y conocimientos durante las horas de trabajo.

A la Prof. Rosalía Gallego, por la realización de la inmunohistoquímica, por estar siempre dispuesta a echar una mano y por su sentido del humor.

A la Profesora Carmen Segura Iglesias, por su apoyo y generosidad.

A la Dra. Manuela Alonso, por enseñarme tantas cosas nada más llegar al laboratorio.

Al Prof. J.L. Segade, por ceder amablemente sus instalaciones y su equipo de estereotaxia.

A la Dra. Elena López, por sus conocimientos y asesoramiento sobre GDNF y la vitamina D en el sistema nervioso, y también por su apoyo en los malos momentos: “Gracias de todos modos”.

A Olga y Marcos, por su asesoramiento con los cultivos primarios.

A mis compañeros de los cursos de doctorado Rubén, Roberto, Sonia, Esther y Eduardo (ya doctores), Cristina y Ana (que decidieron tomar otro rumbo), y finalmente, a “Cañi” e Isabel Carneiro (que como yo, están a punto de ser doctoras).

A la secretaria del departamento “Marga”, por ser siempre tan amable y estar dispuesta a ayudar en lo que sea.

ÍNDICE

1. RESUMEN	15
2. INTRODUCCIÓN	19
I. LA VITAMINA D.	21
1. <i>Metabolismo de la Vitamina D.</i>	21
1.1. Regulación de la concentración de 1,25(OH) ₂ D ₃	23
2. <i>Receptores nucleares de hormonas: El Receptor de la Vitamina D.</i>	23
2.1. Estructura del Receptor de la Vitamina D.	24
2.2. Regulación del Receptor de la Vitamina D.	27
3. <i>Interacción del Receptor de la Vitamina D con el ADN.</i>	28
3.1. Coactivadores.	29
3.2. Represores.	30
4. <i>Acciones biológicas de la Vitamina D.</i>	30
4.1. Funciones Clásicas: Control de la Homeostasis Mineral de Calcio y Fósforo.	31
4.2. Funciones No Clásicas.	31
II. GANGLIOS BASALES	33
1. <i>Conexiones de los Ganglios Basales.</i>	34
1.1. Aferencias a los Ganglios Basales.	34
1.2. Eferencias de los Ganglios Basales.	35
2. <i>Neuronas de los Ganglios Basales.</i>	37
2.1. Estriado.	37
2.2. Sustancia Negra.	38
III. NEUROTRANSMISORES Y RECEPTORES.	39
1. <i>Neurotransmisor GABA.</i>	39
2. <i>Neurotransmisor Glutamato.</i>	40
3. <i>Neurotransmisor Acetilcolina.</i>	40
4. <i>Neurotransmisor Dopamina.</i>	40
IV. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.	44
1. <i>Tratamiento.</i>	45
2. <i>Modelos experimentales de Parkinson.</i>	47
V. LOS FACTORES NEUOTRÓFICOS.	50
1. <i>Familia del Factor Neurotrófico derivado de la Glia o GDNF.</i>	51
2. <i>Factor Neurotrófico derivado de la Glia (GDNF).</i>	51
2.1. Estructura.	51
2.2. Complejo Receptor del GDNF.	52
2.3. Función y Ontogenia.	54
3. OBJETIVOS	57
4. MATERIAL Y MÉTODOS	61

1. ANIMALES.....	63
2. TRATAMIENTOS.....	63
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	64
4. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	67
5. CULTIVOS PRIMARIOS.....	69
6. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO.....	70
6.1. Extracción de ARN total.....	70
6.2. Cuantificación de ARN total.....	71
6.3. RT-PCR.....	72
6.4. Análisis de Restricción.....	73
7. EXPRESIÓN DE PROTEÍNA.....	74
7.1. Extracción de la proteína.....	74
7.2. Western Blot.....	74
8. SUPERVIVENCIA CELULAR.....	75
9. ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO.....	76
10. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	76
10.1. Inmunohistoquímica de los experimentos in vivo.....	76
10.2. Inmunohistoquímica de cultivos primarios neuronales.....	78
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	79
5. RESULTADOS.....	81
1. ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	83
1.1. Efecto de la administración intraperitoneal de Vitamina D sobre la expresión de GDNF en ratas macho adultas.....	83
1.1.1. Expresión de ARNm de GDNF.....	83
1.1.2. Expresión proteica de GDNF.....	85
1.2. Modelo Hemiparkinsoniano animal inducido por 6-Hidroxidopamina (6-OHDA).....	87
1.2.1. Inyección de la solución de Fluoresceína.....	87
1.2.2. Efecto de la inyección estereotáxica de 6-OHDA en las fibras nigroestriatales.....	88
1.2.3. Efecto de la administración i.p. de Vitamina D antes de lesionar estereotáxicamente las fibras nigroestriatales con 6-OHDA (EFECTO PRE-LESIÓN).....	94
1.2.4. Efecto de la administración i.p. de Vitamina D después de lesionar estereotáxicamente las fibras nigroestriatales con 6-OHDA (EFECTO POST-LESIÓN).....	100
1.2.5. Lesiones simuladas.....	106
1.2.6. Efecto del tratamiento i.p. con Vitamina D pre y post-lesión con 6-OHDA sobre la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa en las neuronas de la sustancia negra.....	111
2. ESTUDIO <i>IN VITRO</i>	113
2.1. Efecto de la administración de Vitamina D sobre la expresión de GDNF in vitro en cultivos primarios neuronales.....	113
2.1.1. Curva Dosis-Respuesta.....	114
2.1.2. Curva Tiempo-Respuesta.....	115
2.1.3. Expresión de ARNm de GDNF.....	117

2.1.4. Expresión proteica de GDNF.....	118
2.2. <i>Efecto de la neurotoxina 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) sobre la viabilidad celular y la expresión de GDNF en cultivos primarios neuronales.</i>	120
2.2.1. Expresión de ARNm de GDNF.....	120
2.2.2. Expresión proteica de GDNF.....	121
2.2.3. Ensayo de Supervivencia Celular (MTT).	122
2.3. <i>Efecto de la administración previa de Vitamina D a la neurotoxina 6-OHDA.</i>	123
6. DISCUSIÓN	127
1. EFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA EXPRESIÓN DE GDNF EN EL ESTRIADO (CAUDADO).	129
2. MODELO EXPERIMENTAL DE ANIMAL HEMIPARKINSONIANO INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN DE LA NEUROTOXINA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA).	133
2.1. <i>Efecto de la neurotoxina 6-OHDA inyectada en el haz prosencefálico medial.</i>	133
2.2. <i>Efecto de Vitamina D administrada i.p. antes de inyectar 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (Efecto Pre-lesión).</i>	138
2.3. <i>Efecto de Vitamina D administrada i.p. después de inyectar 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (Efecto Post-lesión).</i>	141
2.4. <i>Efecto de Vitamina D sobre la morfología neuronal dopaminérgica.</i>	142
7. CONCLUSIONES	145
8. BIBLIOGRAFÍA	149
9. ABREVIATURAS	169

1. RESUMEN

*La **Vitamina D** es una hormona de naturaleza liposoluble que además de ejercer sus efectos clásicos sobre la homeostasis del calcio y fósforo, también actúa modulando, entre otras cosas, la expresión de distintos genes diana. Uno de estos genes es el gen del **Factor Neurotrófico derivado de la Glia (GDNF)**, el cual juega un papel fundamental durante el desarrollo, diferenciación y la supervivencia neuronal, lo cual hace suponer que el aumento de su expresión en determinados estados patológicos como la Enfermedad de Parkinson, sea un factor clave a la hora de evitar el deterioro celular, concretamente neuronal, y/o el avance del trastorno neurodegenerativo.*

En este trabajo se analizó el efecto de la administración sistémica de Vitamina D en ratas normales y hemiparkinsonianas lesionadas con la neurotoxina 6-OHDA en el haz prosencefálico medial del hemisferio izquierdo cerebral (antes y después de inducir la lesión), sobre la expresión de GDNF y el grado de degeneración de la población de neuronas dopaminérgicas en el sistema nigroestriatal. También se estudió el efecto de la administración de vitamina D y 6-OHDA en cultivos primarios neuronales de estriado sobre la expresión de GDNF.

Nuestros resultados indican que la administración de vitamina D incrementa la expresión de GDNF a nivel de ARNm y proteína en ratas normales, e induce la síntesis proteica del factor neurotrófico en el modelo hemiparkinsoniano; este incremento de GDNF parece ser suficiente para proteger pero no para reparar las neuronas dopaminérgicas del proceso neurodegenerativo. La vitamina D también aumenta la expresión de GDNF en las neuronas del estriado en cultivo, y este efecto se ve potenciado cuando se administra antes de exponer las células ante la toxina 6-OHDA.

La Vitamina D, directamente o a través de otros factores de transcripción mediadores, incrementa la expresión de GDNF en el sistema nigroestriatal, lo cual hace suponer que pueda ejercer un efecto neuroprotector en determinados estados patológicos.

2. INTRODUCCIÓN

I. LA VITAMINA D.

1. Metabolismo de la Vitamina D.

La vitamina D es un secoesteroide que participa en numerosas funciones biológicas del organismo. Aproximadamente dos tercios de la vitamina D contenida en el organismo humano se sintetiza en la piel a partir de la molécula precursora 7-dehidrocolesterol, por acción de la luz ultravioleta, mientras que el tercio restante se obtiene de la dieta (aceites de pescado, huevo e hígado).

La vitamina D en la circulación sanguínea interacciona con proteínas de unión a la vitamina D (*DBP, Vitamin D Binding Protein*), proteínas plasmáticas también conocidas como Globulinas-Gc que la conducen al hígado y riñón donde será bioactivada (figura 1).

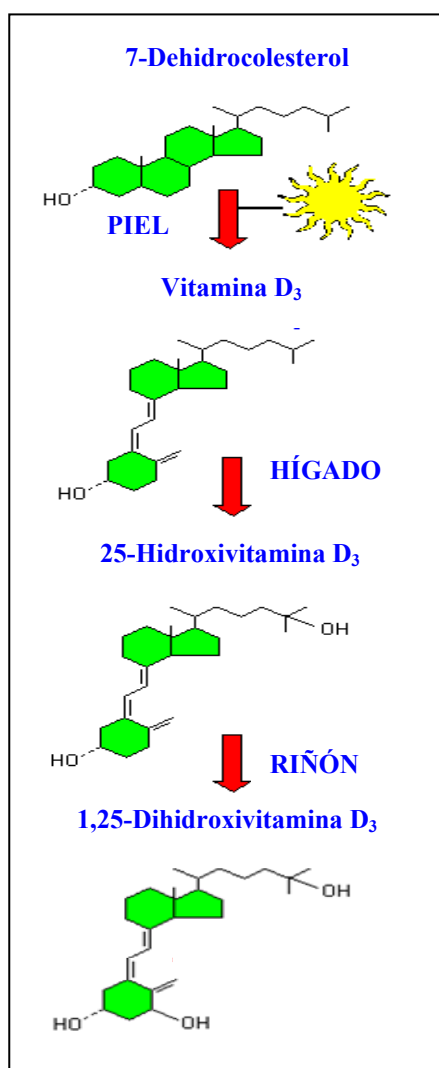


Figura 1. Representación esquemática del anabolismo de la vitamina D.

El primer paso para la bioactivación de la vitamina D es su hidroxilación hepática por la enzima 25-hidroxilasa, formándose la 25-hidroxivitamina D₃ [25(OH)D₃]. En un segundo paso, se produce una nueva hidroxilación del metabolito 25(OH)D₃, dando lugar a la forma biológicamente más activa de la hormona, la 1,25(OH)₂D₃ o Calcitriol; esta reacción es catalizada por la enzima 25-hidroxivitamina D₃-1- α -hidroxilasa (1- α -hidroxilasa) y ocurre principalmente en el riñón. Aunque la principal fuente biosintética de 1,25(OH)₂D₃ es el riñón, estas enzimas anabólicas también se detectan en otros tejidos (como placenta, próstata, colon, piel), en células (como monocitos y macrófagos), y en líneas celulares de adenocarcinoma mamario (T47D y MCF-7), lo cual hace suponer que la síntesis de 1,25(OH)₂D₃ no es exclusivamente renal (Tangpricha y col., 2001; Zehnder y col., 2001).

La hormona activa permanece en la circulación sanguínea durante unas 7 horas. Debido a su carácter liposoluble, la 1,25(OH)₂D₃ penetra fácilmente en las células diana a través de la membrana plasmática. La 24-hidroxilación de 1,25(OH)₂D₃ es el primer paso catabólico en la eliminación de la hormona activa, dando lugar a la formación de 1,24,25-trihidroxivitamina D₃, la cual es 10 veces menos potente que la 1,25(OH)₂D₃. Posteriores reacciones oxidativas de la 1,24,25-trihidroxivitamina D₃ conducen a la pérdida progresiva de la actividad biológica y finalmente, a la producción de ácido calcitroico soluble en agua que es excretado a través de la orina (figura 2).

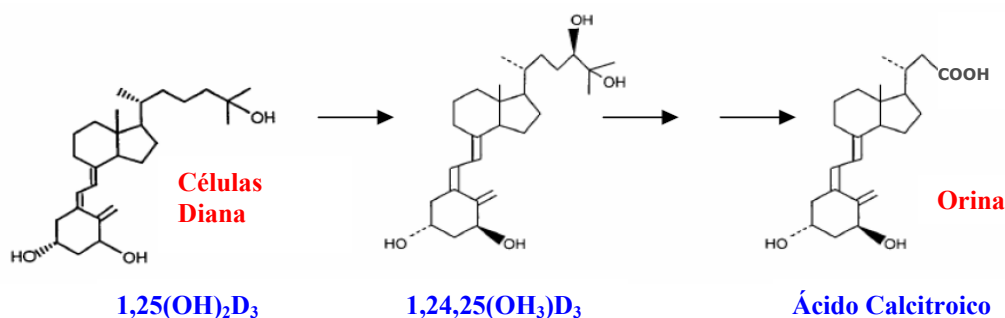


Figura 2. Representación esquemática del catabolismo de la vitamina D.

1.1. Regulación de la concentración de 1,25(OH)₂D₃.

La 1,25(OH)₂D₃ tiene una gran potencia para elevar los niveles de calcio y fosfato séricos, por lo que la concentración circulante de 1,25(OH)₂D₃ (aprox. 75 pM) está bajo un control estricto que se consigue por regulación del balance entre la síntesis y degradación de la 1,25(OH)₂D₃.

Los principales reguladores de la concentración de 1,25(OH)₂D₃ en suero son la hormona paratiroidea (PTH), calcio, fosfato y la propia 1,25(OH)₂D₃. La PTH regula la concentración de calcio en suero, de tal manera que se secreta PTH en estado hipocalcémico. La hormona paratiroidea, a través de AMPc y Proteín kinasa C, incrementa la concentración de 1,25(OH)₂D₃ ya que aumenta la tasa de transcripción del gen 1- α -hidroxilasa, y ralentiza la degradación de la misma por disminuir la actividad de la enzima D-24-hidroxilasa. También hay evidencias que indican que el calcio y fosfato son capaces de regular directamente los niveles de 1,25(OH)₂D₃ al modular los niveles de expresión de ARNm de los genes D-24-hidroxilasa y 1- α -hidroxilasa (Brown y col., 1999).

La 1,25(OH)₂D₃ es capaz de inhibir su propia producción reduciendo los niveles de secreción de PTH, y por consiguiente, inhibiendo la actividad de la enzima 1- α -hidroxilasa, y activando la expresión del gen D-24-hidroxilasa. Otros factores que actúan sobre la producción de la 1,25(OH)₂D₃, son los esteroides suprarrenales, los estrógenos (incrementan los niveles séricos de 1,25(OH)₂D₃ mediante la activación de la síntesis de las proteínas movilizadoras de vitamina D), las hormonas tiroideas (incrementan la movilización del fósforo óseo y su reabsorción tubular renal, disminuyendo así la actividad de la 1- α -hidroxilasa), y en menor grado, otras hormonas tales como GH, prolactina e insulina (DeLuca y col. 1990; Brown y col., 1999).

2. Receptores nucleares de hormonas: El Receptor de la Vitamina D.

La Vitamina D ejerce sus acciones biológicas mediante la unión con gran afinidad ($K_d = 0.1$ nM) a un receptor que actúa como un factor de transcripción activado por ligando, el receptor de la vitamina D o VDR. Se trata de una proteína soluble, lábil y poco abundante que se puede localizar tanto en el núcleo, como en el citoplasma celular, desde donde se movilizaría hacia el núcleo a través del sistema de microtúbulos tras la administración de 1,25(OH)₂D₃ (Kamimura y col., 1995). Fue clonado por primera vez en aves, y representó la primera

secuencia de receptor descrita para una vitamina (McDonnell y col., 1987). Posteriormente, Baker y col. en 1988, clonaron el ADNc del VDR humano a partir de librerías de ADNc intestinal y de la línea celular de cáncer de mama, T47D. El ADNc clonado tiene una secuencia de 4.6 kb que codifican para 427 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 48.3 kD, una región 5' no codificante de 115 pb, una región codificante de 1.2 pb, y una región 3' no codificante de 3.2 kb. Mediante el estudio de la estructura primaria aminoacídica del receptor, se pudo apreciar la similitud que presenta respecto a la organización molecular de los receptores esteroideos, de las hormonas tiroideas y de la vitamina A, lo cual justifica su inclusión dentro de la superfamilia de receptores nucleares (Evans, 1988).

El gen del Receptor de la Vitamina D se colocaliza en el cromosoma 12q humano y en el cromosoma 7 de rata, próximos a los genes de otros factores de transcripción como el de sp-1 o el receptor del ácido retinoico, y este hecho, además de su similitud estructural y funcional, hace suponer que todos ellos proceden de un mismo gen ancestral (Szpirer y col., 1991). El gen de VDR contiene 11 exones intercalados por intrones, que se expanden aproximadamente 7b. El extremo 5' no codificante del gen incluye los exones 1A, 1B y 1C; los ocho exones restantes (exones 2-9) codifican la porción estructural del producto del gen de VDR, los exones 2 y 3, están implicados en la unión al ADN y los exones 7, 8 y 9 en la unión al ligando (Hughes y col., 1988).

2.1. Estructura del Receptor de la Vitamina D.

Los receptores nucleares de hormonas se caracterizan por tener una estructura común integrada por cinco o seis dominios funcionales (figura 3) (Germain y col., 2003):

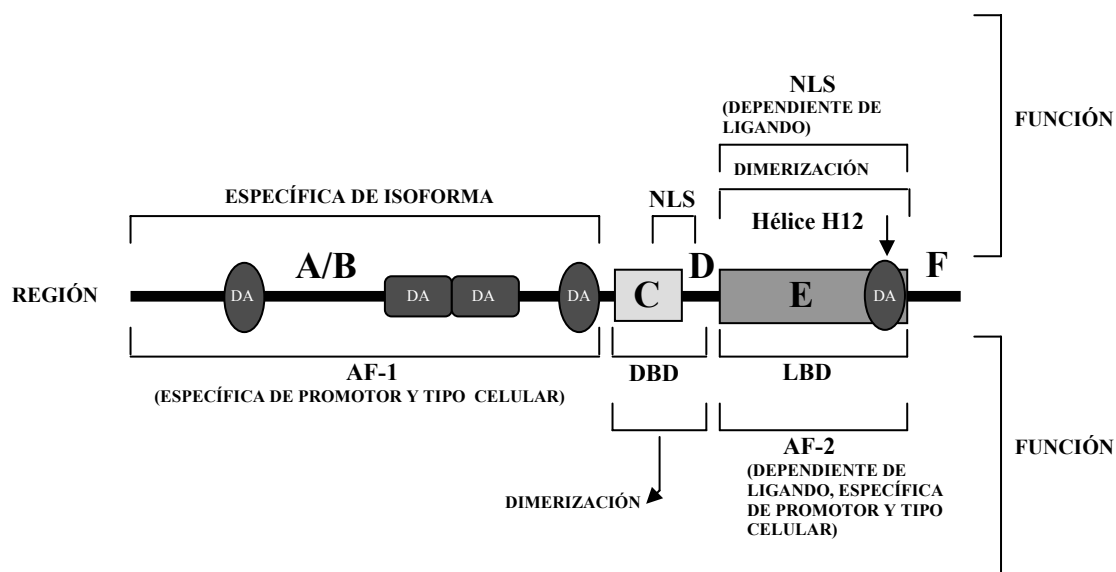


Figura 3. Ilustración esquemática de la organización estructural y funcional de los receptores nucleares. Las regiones C y E conservadas evolutivamente se representan en cajas, mientras que las regiones divergentes A/B, D y F se presentan como una barra negra. En algunos receptores nucleares se han descrito dos funciones de activación (AFs), uno constitutivamente activo (AF-1) en la región A/B, y otro inducible por el ligando (AF-2) en la región E. Dentro de la función de activación AF-1 se identificaron los dominios de transactivación (DAs) para el receptor de estrógenos (RE) y progesterona (PR), mientras que dentro de AF-2, en la región E, se localiza el dominio de activación para el receptor de retinoides y de la hormona tiroidea.

A. Dominio A/B.

Se localiza en el extremo N-terminal y es el más variable en tamaño y secuencia dentro de la superfamilia. Las regiones A/B están sometidas a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, dando lugar a la expresión de muchas isoformas de receptores a partir de un solo gen. Este dominio modulador generalmente contiene una función de activación transcripcional constitutivamente activa, denominada AF-1 (Bocquel y col., 1989).

B. Región C.

En la región C se encuentra el dominio de unión al ADN (*DNA Binding Domain, DBD*), el cual permite la unión del receptor a secuencias específicas de ADN conocidas como Elementos de Respuesta Hormonal (*ERH*). Esta zona es la más conservada en la superfamilia de los receptores nucleares, y en su estructura están presentes 9 residuos de cisteína, 8 de los cuales son invariables y están tetrahédricamente coordinados con 2 iones de zinc, integrando los llamados “dedos de zinc” (figura 4), así como otros residuos conservados en la superfamilia de receptores nucleares, necesarios para la unión con gran afinidad al ADN. Dentro de este

dominio C hay varios elementos de secuencia (denominados Caja P, Caja D, Caja T y Caja A) que definen o contribuyen en la especificidad por los elementos de respuesta, y en la dimerización con otros receptores nucleares.

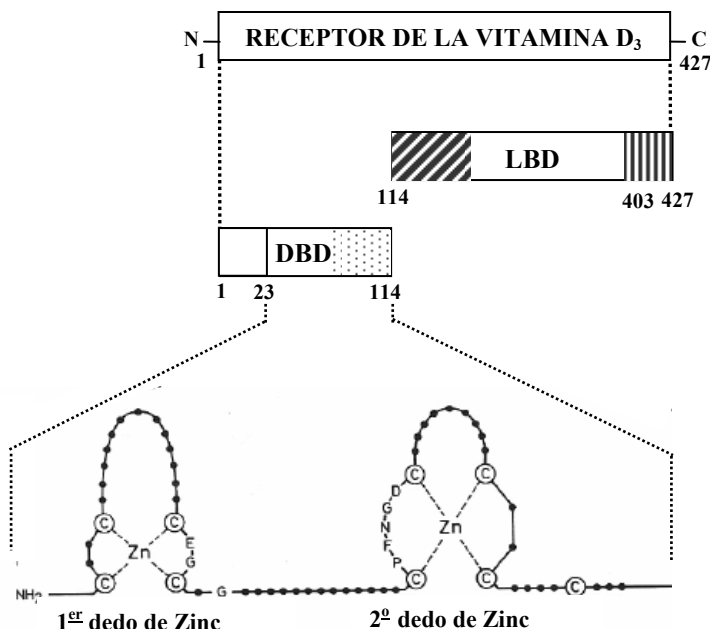


Figura 4. Estructura del receptor de la vitamina D (VDR) y de la región de unión al ADN (DBD). Se representan los distintos dominios del receptor, con solapamiento entre algunos de ellos. En el dominio de unión al ADN (DBD) se observan las 4 cisteínas coordinadas con un ión de zinc en cada dedo (rodeadas con un círculo). En el segundo dedo de zinc y en su extremo carboxiterminal está presente una cisteína que se conserva invariablemente en todos los miembros de la familia de receptores nucleares. En la porción C-terminal del primer dedo de zinc (Caja P) y en la porción N-terminal del segundo dedo (Caja D) se representan los aminoácidos implicados en contactos proteína-proteína.

C. Región D.

La región D de los receptores nucleares está menos conservada con respecto a las regiones adyacentes C y E; permite al dominio de unión al ligando y al DBD adoptar distintas conformaciones sin generar problemas estéricos. La región D contiene una señal de localización nuclear (*NLS*) (figura 1), o por lo menos algunos elementos de la *NLS* funcional. Esto hace que la gran mayoría de receptores nucleares se localicen en el núcleo. No obstante algunos receptores esteroideos (andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides), en ausencia de ligando, residen en localizaciones citoplasmáticas, y sólo se traslocan al núcleo cuando interactúan con el ligando (Hager y col., 2000).

D. Región E.

Se trata del dominio de unión al ligando (*Ligand Binding Domain, LBD*). Además, codifica un gran número de funciones, muchas de las cuales operan de forma dependiente del ligando. Por ejemplo, incluye la función de activación transcripcional inducible por ligando o la función de dimerización.

E. Región F.

Algunos receptores poseen en el extremo C-terminal, la región F, la cual se caracteriza por estar evolutivamente poco conservada. La región F puede jugar un papel clave reclutando coactivadores a la región E, así como determinando la especificidad del LBD por el coactivador (Peters y Khan, 1999).

2.2. Regulación del Receptor de la Vitamina D.

La expresión de VDR es regulada tanto a nivel transcripcional como postraduccional por acción de la PTH y de otros factores de crecimiento y hormonas, como estrógenos, hormonas tiroideas, glucocorticoides y ácido retinoico, y su propio ligando, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que son capaces de modificar los niveles de ARNm de VDR de una manera tejido específico. Además, tanto el estado del ciclo celular como de diferenciación celular influyen en la expresión del ARNm de VDR en una gran variedad de tipos celulares. El principal regulador positivo de la concentración de VDR, es su propio ligando, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, de tal manera que puede actuar incrementando la vida media del receptor libre (Wiese y col., 1992) o a nivel transcripcional, incrementando los niveles de ARNm de VDR tras ser administrada.

El VDR se encuentra ampliamente distribuido, tanto en los mencionados órganos diana clásicos implicados en la homeostasis mineral, como en muchos otros tejidos considerados no clásicos, tales como el hígado, páncreas, piel, mama y cerebro (Prüfer y col., 1999; Veenstra y col., 1998; Welsh y col., 2003) lo que ha llevado a especular sobre la relación de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con ciertas patologías como la osteodistrofia renal, osteoporosis, leucemia, psoriasis, raquitismo, diabetes y cáncer (Brown 1998; Brown y col., 1999).

3. Interacción del Receptor de la Vitamina D con el ADN.

El complejo hormona-receptor reconoce y se une a determinadas secuencias de ADN llamadas Elementos de Respuesta a Vitamina D (VDRE), localizadas en la vecindad de los genes regulados por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (generalmente en dirección 5' respecto al sitio de inicio de la transcripción) (Rachez y Freedman, 2000). Esta interacción hormona-receptor-ADN provoca cambios en la cromatina que incrementan o disminuyen la tasa de transcripción por parte de la ARN polimerasa II. A su vez, el VDR unido al ADN, también puede interaccionar con otros factores de transcripción (coactivadores y represores), produciendo efectos positivos o negativos adicionales sobre la expresión génica. De forma general, los VDRE se describen como repeticiones directas de una secuencia consenso de 6 nucleótidos (AGGTCA), con un espaciamiento de 3 nucleótidos entre cada mitad del elemento (Umesono y col., 1991). En un principio se pensó que el VDR no se une de forma eficaz a su ERH como homodímero, sino que requiere la colaboración de un factor adicional con el que heterodimerizar, el receptor X del Ácido Retinoico (RXR), no obstante, VDR también es capaz de modular la expresión génica de forma independiente al RXR (Seoane y Pérez-Fernández, 2006). Este factor RXR, farmacológica y estructuralmente distinto del receptor del Ácido Retinoico (RAR), se une forma estable a VDR, e incrementa la unión de VDR al VDRE (Towers y col., 1993; Cheskis y Freedman, 1994). La adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ posiblemente induce un cambio conformacional en VDR que favorece la interacción heterodimérica VDR-RXR y el reconocimiento específico del VDRE.

El VDR y los receptores nucleares en general, poseen la capacidad de poder unirse al ADN aunque éste se encuentre cubierto de histonas (Li y Wrangle, 1995; Wong y col., 1997). La unión del ligando a los receptores nucleares comienza una serie de eventos que hacen que el ADN se libere de la represión nucleosomal, desempaquetándose, para iniciar la transcripción génica.

El cambio conformacional inducido por el ligando tiene un papel fundamental en este proceso, ya que induce la dimerización y asociación del receptor a su elemento de respuesta y genera nuevas superficies sobre el receptor que permiten la unión de otras moléculas coactivadoras o represoras, esenciales para iniciar la cascada de activación o inhibición transcripcional, respectivamente.

3.1. Coactivadores. Los coactivadores regulan la activación de los genes diana, primero, remodelando y desempaquetando la estructura de la cromatina en la región promotora para facilitar la unión de otros activadores y de la ARN polimerasa II a la maquinaria transcripcional, y segundo, reclutando complejos proteicos (complejo mediador) que interaccionan con una o más subunidades de la ARN polimerasa II y que estimulan el inicio de la transcripción al estabilizar el complejo de preiniciación (Näär y col., 2001; Urnov and Wolffe, 2001). En este sentido hay dos clases de complejos enzimáticos que parecen ejercer un papel clave en la activación transcripcional mediada por el desempaquetamiento nucleosomal:

A. Histona acetiltransferasas (HATs).

Regulan la estructura de los nucleosomas modificando el patrón de acetilación de histonas (Sternier y Berger, 2000; Wu y Grunstein, 2000). Los coactivadores reclutados por los receptores nucleares que contienen actividad HAT intrínseca incluyen la Familia de Coactivadores p160 del Receptor Esteroideo (SRC) (Leo y Chen, 2000) y los Coactivadores generales CBP/p300 y PCAF (Yao y col., 1996; Chen y col., 1999).

B. Factores Remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.

A diferencia de las HATs, estos complejos (como SW1/SNF o ISWI) son capaces de alterar la conformación de los nucleosomas por deslizamiento del octámero de histonas a otro sitio sobre el ADN o por la torsión helicoidal del ADN (Havas y col., 2000; Sudarsanam y Winston, 2000).

Estos dos complejos parecen actuar sinérgicamente para establecer una estructura de la cromatina apropiada para la formación del complejo de preiniciación (Bevan y Parker, 1999; Urnov y Wolffe, 2001).

Además de estos complejos enzimáticos, existen los llamados Complejos Mediadores tales como TRAP/DRIP, que no modifican la estructura de la cromatina (Fondell y col., 1996; Rachez y col., 1998), sino que actúan mediando la unión directa entre el receptor activado por ligando y la holoenzima ARN polimerasa II, y posiblemente, reclutando componentes limitantes dentro del complejo de preiniciación. Estos complejos mediadores garantizan la estabilidad del complejo de preiniciación y de este modo, el inicio de la transcripción (Chiba y col., 2000; Rachez y Freedman, 2000).

Las HAT y los complejos SWI/SNF son los primeros en ser reclutados por los receptores nucleares en respuesta a la hormona o ligando, generando el remodelado de la estructura local de la cromatina. La disociación del complejo HAT permitiría unirse al complejo coactivador tipo mediador a los receptores nucleares y reclutar a la holoenzima ARN polimerasa II (Bevan y Parker, 1999; McKenna y col., 1999; Chen y col., 1999; Rachez y Freedman, 2000).

3.2. Represores. Varios miembros de la familia de receptores nucleares parecen ejercer su función biológica por represión activa de la transcripción de los genes diana (Glass y Rosenfeld, 2000; Hu y Lazar, 2000). RAR, TR y VDR, son capaces de reprimir la transcripción basal de los genes diana por interacción con los HREs en ausencia de ligando (Chen y col., 1999). Los receptores nucleares interaccionan con proteínas correpresoras tales como N-CoR (Co-represor Nuclear) (Tagami y col., 1998), Alien (Dressel y col., 1999) y SMTR (Receptores Tiroideos y Retinoides Mediadores de Silenciamiento) (Chen y col., 1999), las cuales median la represión por reclutamiento del Complejo Desacetilasa de Histonas (*HDACs*), el cual posee actividad desacetilasa de histonas que contrarresta la acción de las HATs, permitiendo incrementar el grado de empaquetamiento del ADN (Kao y col., 2000; Wen y col., 2000). También existen dímeros de receptores nucleares (Yoh y Privalsky, 2001) dependientes de ligando (Rosenfeld y Glass, 2001) que tienen la capacidad de inhibir la transcripción génica.

4. Acciones biológicas de la Vitamina D.

Todos los efectos de la vitamina D pueden agruparse en *Efectos Genómicos* (de respuesta tardía), los cuales implican la regulación de la expresión génica a través de VDR, y *Efectos No Genómicos* (de respuesta rápida), dependientes de un receptor de membrana (VDRm) asociado a canales de calcio que activan ciertos sistemas de transducción de señales, tales como la vía de las proteínas quinasas y fosfolipasa C (Norman y col., 1992). También hay evidencias que indican que las respuestas rápidas son capaces de modular las acciones de la vía genómica de la vitamina D mediante la fosforilación del VDR nuclear; esta fosforilación podría incrementar la afinidad del VDR a los complejos coactivadores para activar así la expresión génica.

4.1. Funciones Clásicas: Control de la Homeostasis Mineral de Calcio y Fósforo.

La vitamina D y PTH coordinan la homeostasis del calcio y fósforo para asegurar la disponibilidad mineral para las distintas funciones biológicas; esto se consigue por la acción coordinada de la glándula paratiroidea, riñón, intestino y hueso (Brown y col., 1999).

El papel más importante de la vitamina D en la homeostasis mineral es el de estimular la eficiencia del intestino delgado para absorber el calcio y fósforo de la dieta, facilitando la entrada de calcio a través de la membrana plasmática hacia el interior de los enterocitos, y a través de la membrana basolateral, hacia la circulación sanguínea. Además, actúa en el riñón, reduciendo la excreción de calcio en la orina y aumentando la reabsorción del calcio renal, y en el hueso, movilizándolo desde el hueso hacia el torrente sanguíneo en estados carenciales del organismo. El hueso es otro de los órganos diana para la vitamina D, donde juega un papel importante en la mineralización y mantenimiento de la naturaleza dinámica del hueso. Además de controlar la disponibilidad de calcio y fósforo, la vitamina D también regula los niveles de hormonas tales como PTH, péptido relacionado con la hormona paratiroidea y factor de crecimiento similar a la insulina, así como la síntesis de proteínas matriciales como colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina y proteína matricial Gal.

4.2. Funciones No Clásicas.

Además de las funciones clásicas que básicamente controlan la homeostasis del calcio y del fósforo, la Vitamina D, a través de su receptor VDR, también interviene en otros procesos tales como la proliferación y diferenciación celular, modulación de la respuesta inmune, la regulación de la síntesis de hormonas peptídicas y el desarrollo de procesos oncogénicos (Welsh y col., 2003; Brown y col. 1999) en los llamados tejidos diana no clásicos mencionados anteriormente.

En el Sistema Nervioso Central (SNC), además de ejercer su papel clásico de regular el metabolismo del calcio a través de la expresión de proteínas de unión al calcio, la Vitamina D y su receptor VDR, que se localizan en muchas regiones del SNC de rata durante el desarrollo embrionario, parecen desempeñar un papel fundamental en el crecimiento y diferenciación neuronal del cerebro embrionario (Veenstra y col., 1998; Eyles y col., 2003). Este amplio

patrón de distribución del VDR y su ligando descrito durante la etapa embrionaria, se mantiene en el cerebro adulto (Stumpf y O'Brien, 1987), donde ejerce un efecto neuroprotector. En este sentido, hay evidencias que indican que la baja expresión de la proteína de unión al calcio, calbindina-D28k, característica de trastornos neurodegenerativos como el Parkinson, Alzheimer o Huntington en la sustancia negra, núcleos basales e hipocampo, respectivamente, posiblemente se correlacione con una baja expresión del VDR (Brachet y col. 2005).

Uno de los mecanismos neuroprotectores ejercidos por la Vitamina D, consiste en modular la síntesis de distintos factores neurotróficos. La hormona estimula la expresión de ARNm y proteína de neurotrofinas, como el factor de crecimiento neural (NGF), y del factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), tanto en modelos *in vivo* (Saporito y col., 1994; Wang y col. 2000), como en líneas celulares (Musiol y col., 1997; Neveu y col., 1994; Veenstra y col., 1997; Naveilhan y col., 1996) y cultivos primarios (Neveu y col., 1994; Cornet y col., 1998; Baas y col., 2000; Brown y col., 2003). Además también existen trabajos realizados en cultivos primarios de tejido mesencefálico fetal en los que se muestra el efecto protector de 1,25(OH)₂D₃ frente a los efectos neurotróficos del glutamato o las toxinas dopaminérgicas MPTP y 6-OHDA (Ibi y col., 2001; Wang y col., 2001).

La otra acción protectora de la Vitamina D conlleva la disminución del estrés oxidativo celular al modular la maquinaria de detoxificación. De esta manera, incrementa los niveles de glutathione intracelular (Garcion y col., 1996), inhibe la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa II (NOS II) productora de óxido nítrico (Garcion y col., 1997; Garcion y col., 1998) e incrementa la resistencia celular a la toxicidad inducida por las especies oxigénicas reactivas (ROS) (Wang y col., 2001). Distintos estudios realizados hasta el momento indican que la acumulación intracelular de ROS puede ser responsable de la degeneración y muerte celular características del Parkinson y del Huntington (Giasson y col., 2002; Halliwell, 2001; Tabner y col., 2001); del mismo modo, la metabolización neuronal de neurotoxinas utilizadas para crear modelos animales de Parkinson, 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y MPTP, también genera ROS responsables de un síndrome similar al Parkinson humano.

II. GANGLIOS BASALES.

Los Ganglios Basales, en los primates, son un grupo de núcleos interconectados con funciones tanto motoras como no motoras. Anatómicamente, el término Ganglios Basales engloba: Caudado, Putamen, Globo Pálido, *Núcleo Accumbens Septi* y el Tubérculo Olfatorio, todos ellos localizados topográficamente en la “base” del cerebro. Funcionalmente, sentido en el que será empleado el término en este texto, la sustancia negra y el núcleo subtalámico están incluidos en los ganglios basales. El término *Cuerpo Estriado* se refiere al caudado, putamen y globo pálido. Los términos *Estriado*, *Estriado Dorsal* y *Neostriado* hacen referencia al conjunto del caudado y putamen. Los términos *Pálido* y *Paleostriado* se aplican al globo pálido. Un término que engloba al pálido y putamen es el *Núcleo Lentiforme*. Los ganglios basales anatómicos derivan embriológicamente del telencéfalo, mientras que el núcleo subtalámico deriva del diencefalo y la sustancia negra del mesencéfalo.

La corteza cerebral, fundamentalmente el lóbulo frontal, junto al cerebelo y los ganglios basales, son los que controlan la actividad de los circuitos nerviosos de la médula espinal y del tronco cerebral implicados en las actividades motoras voluntarias del individuo. El tálamo, una estructura diencefálica, sirve como enlace entre estas estructuras cerebrales: Ganglios basales, cerebelo y corteza cerebral (figura 5).

En la organización del control del movimiento, funcionalmente se utiliza el término *Sistema Extrapiramidal*, ideado por Wilson en 1912, para incluir además de los ganglios basales, el núcleo rojo y los núcleos de la formación reticular a los que están conectados. Paralelamente, está el *Sistema Piramidal* que tiene su origen en la corteza cerebral. La función de cada uno de estos sistemas dentro de la organización del movimiento, es diferente.

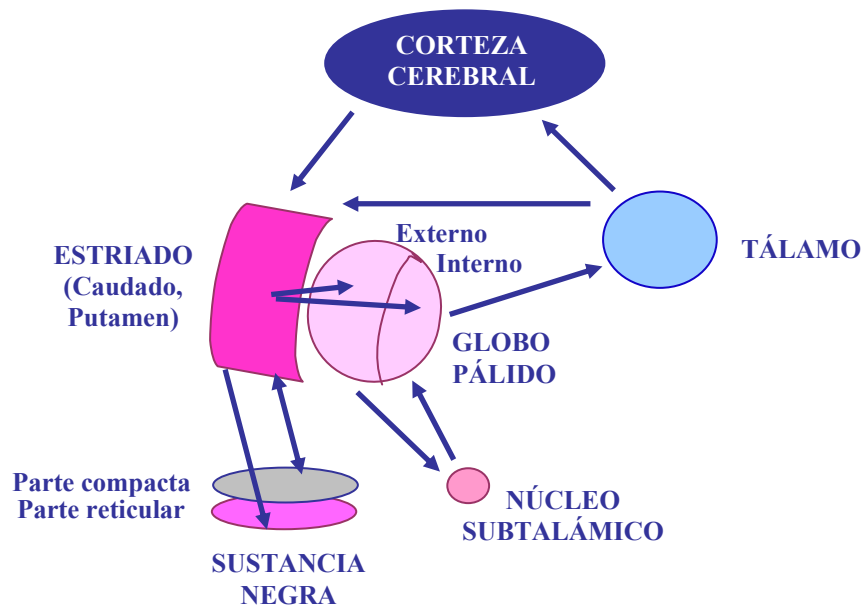


Figura 5. Principales estructuras cerebrales implicadas en el circuito motor.

1. Conexiones de los Ganglios Basales.

1.1. Aferencias a los Ganglios Basales.

El estriado es el núcleo de los ganglios basales que recibe mayor número de aferencias. Sus fuentes son principalmente tres: La corteza cerebral, los núcleos intralaminares del tálamo y los núcleos dopaminérgicos mesencefálicos (figura 5). El estriado recibe aferencias de prácticamente todas las regiones de la corteza cerebral. El putamen recibe aferencias procedentes de la corteza motora primaria y corteza sensorial primaria organizadas somatotópicamente, mientras el caudado las recibe de las áreas corticales de asociación. Podemos suponer que el putamen recibe información “cruda” o no procesada desde los receptores sensoriales vía corteza sensorial primaria, y el caudado, información “procesada” al ser previamente integrada en las áreas de asociación cortical que luego proyectan a esta área del estriado. La principal fuente de proyección dopaminérgica mesencefálica procede de la sustancia negra, en la denominada vía nigroestriatal. El estriado recibe aferencias de otros núcleos del tronco como los núcleos del rafe, que poseen serotonina como neurotransmisor.

1.2. Eferencias de los Ganglios Basales.

Los efectos que ejercen los ganglios de la base sobre otras regiones del sistema nervioso central, están mediados principalmente por las eferencias originadas en el globo pálido y la sustancia negra. Estos núcleos reciben proyecciones desde el estriado, y por tanto la información procedente del estriado es procesada en el globo pálido y la sustancia negra antes de ser enviada al tálamo. El globo pálido se divide en un parte interna o medial y externa o lateral. Las eferencias de la parte interna del globo pálido se dirigen directamente al tálamo, terminando en el núcleo ventral anterior (VA) y en parte del núcleo ventrolateral (VL), aunque algunas fibras terminan en el núcleo centromedial talámico (CM). El VA y VL envían proyecciones a la corteza cerebral, con lo que se cierra el circuito. El núcleo CM perteneciente a los núcleos intralaminares del tálamo envía de regreso sus eferencias al estriado. Las regiones VL que reciben aferencias del globo pálido interno y de la sustancia negra proyectan principalmente al área motora suplementaria de la corteza cerebral (SMA) mientras las áreas VA lo hacen al área premotora (PMA). Las proyecciones internas de los ganglios de la base se organizan en dos sistemas de proyección que parten de poblaciones neuronales del estriado diferentes y terminan en el globo pálido interno (GPi) y la parte reticular de la sustancia negra (SNr); uno de ellos es la llamada **VIA DIRECTA**, que parte de las neuronas del estriado que proyectan directamente al GPi y a la SNr, y el otro, es la **VÍA INDIRECTA**, que termina en el GPi y la SNr a través de un serie de conexiones intermedias que engloban al globo pálido externo (GPe) y al núcleo subtalámico (NST) (figura 6A). La vía directa originada por neuronas GABAérgicas del estriado proyectan monosinápticamente sobre el complejo GPi/SNr. La vía indirecta originada también a partir de las neuronas GABAérgicas del estriado, proyecta polisinápticamente sobre el complejo GPi/SNr pasando previamente por el GPe y NST; esta ruta indirecta está integrada inicialmente por eferencias GABAérgicas inhibitorias del estriado que proyectan sobre el GPe, y de este último sobre el NST, con una eferencia final glutamatérgica excitatoria que proyecta sobre el complejo GPi/SNr. En el estriado, la dopamina facilita la vía directa e inhibe la indirecta, efecto mediado por los receptores D1 y D2, respectivamente. Este modelo, planteado por Alexander (Alexander y Crutcher, 1990), tiene importantes implicaciones en la comprensión fisiopatológica de los trastornos del movimiento como el Parkinson o la Distrofia. Básicamente, se sugiere que la vía directa facilitaría el movimiento en curso de ejecución, mientras la vía indirecta suprimiría los programas motores similares al que se encuentra en ejecución, interfiriendo en el desarrollo del

movimiento deseado. El déficit de dopamina, característico de la enfermedad de Parkinson, conduce a un exceso de la actividad en la vía indirecta y una reducción de la actividad en la vía directa (figura 6B).

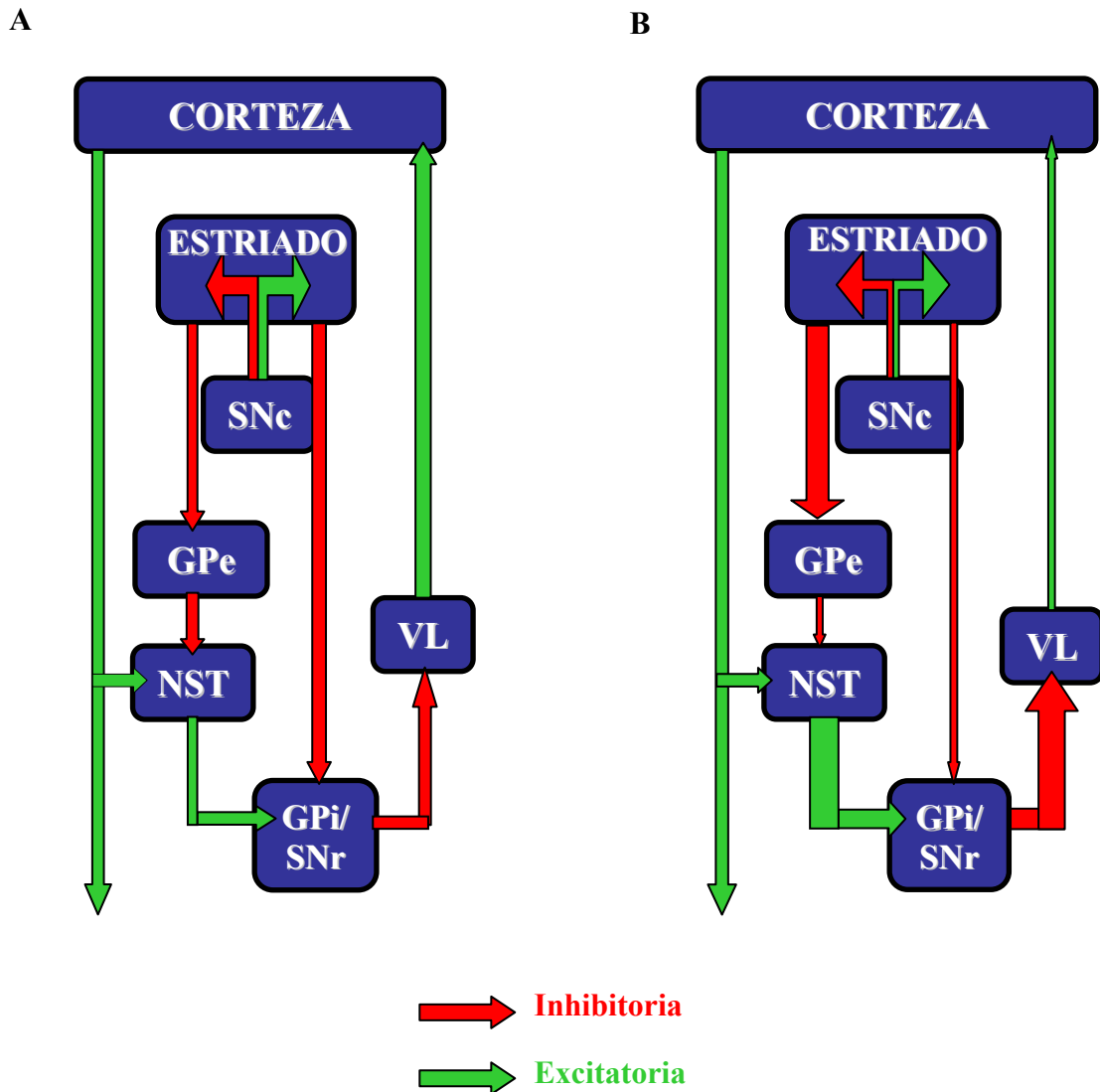


Figura 6. Funcionamiento del circuito neuronal (Vía Directa e Indirecta) de los Ganglios Basales en estado Normal (A) y Parkinsoniano (B). El desequilibrio entre ambos circuitos provoca alteraciones en la descarga del complejo GPi/SNr, generando bradicinesia (Parkinson) o hiperkinesia (Huntington). La bradicinesia resultaría del efecto inhibitorio incrementado de las neuronas GABAérgicas, resultante en una excesiva descarga inhibitoria del complejo GPi/SNr sobre las neuronas talámicas. Esto ocurre cuando se produce la degeneración nigroestriatal (estado parkinsoniano descrito en la figura B), con la consiguiente disminución del contenido de dopamina estriatal y desinhibición de las neuronas GABAérgicas de la vía indirecta. SNe, parte compacta de la sustancia negra; GPe, globo pálido externo; VL, núcleo ventrolateral del tálamo; NST, núcleo subtalámico; GPi, globo pálido interno.

2. Neuronas de los Ganglios Basales.

2.1. Estriado.

Las neuronas del neostriado son fundamentalmente de dos tipos: Espinosas y no espinosas. Las neuronas espinosas (96%) son neuronas de proyección, mientras que las neuronas no espinosas (4%), son interneuronas (Phelps y Vaughn, 1986). El estriado también contiene una pequeña población de interneuronas dopaminérgicas.

El soma de las neuronas de proyección emite varias dendritas que se caracterizan por tener numerosas espinas. Son el blanco de la mayoría de las aferencias intrínsecas y extrínsecas del estriado, lo cual hace que constituyan el centro integrador de información, y por otra parte, también actúan como eferencias del estriado que se proyectan al globo pálido y a la sustancia negra (Chang y col., 1981; Somogy y col., 1979). Estas neuronas contienen como neurotransmisor principal el GABA (Kita y Kitai, 1989; Mugnaini y Oertel, 1985), y coexpresan neuropéptidos como la sustancia P, taquikina (Aronin y col., 1984; Fallon y Leslie, 1986; Penney y Young, 1986), taurina, encefalina, neurotensina, dinorfina y colecistoquinina. Las neuronas espinosas que contienen sustancia P, y habitualmente también dinorfina, proyectan al segmento interno del globo pálido y a la sustancia negra; las que contienen encefalina proyectan al segmento externo del globo pálido. Las neuronas espinosas presentan un patrón de actividad caracterizado por largos períodos de silencio, interrumpidos por cortos períodos de actividad y además, precisan de la acción simultánea de un gran número de aferencias corticales glutamatérgicas para ser activadas.

Las interneuronas son de cuatro tipos: Colinérgicas grandes (Bolam y col., 1984; Kimura y col., 1981; Phelps y col., 1985) y GABAérgicas pequeñas productoras de parvalbúmina (Cowan y col., 1990; Kawaguchi y col., 1993; Kita y col., 1990; Kubota y Kawaguchi, 1993), somatostatina (Difiglia y Aronin, 1982; Takagi y col., 1983), neuropéptido Y o calretinina. La acción de la acetilcolina es predominantemente excitatoria, las terminaciones dopaminérgicas de la proyección nigroestriatal además de contactar con las neuronas espinosas lo hacen también sobre las interneuronas colinérgicas. Las interneuronas GABAérgicas pequeñas son las más abundantes.

2.2. Sustancia Negra.

La Sustancia Negra (SN) está integrada por dos subdivisiones, la Parte Compacta (SNc) y la Parte Reticular (SNr). La parte compacta de la SN contiene neuronas densamente empaquetadas que en primates (no tan obvio en ratas) son de color negro debido a la presencia del pigmento neuromelanina. La mayoría de estas neuronas envían sus axones a lo largo de la vía nigroestriatal al estriado donde liberan el neurotransmisor dopamina.

Las neuronas de la parte reticular de la SN están poco condensadas con respecto a la parte compacta. Muchas de estas neuronas producen el neurotransmisor GABA, pero también hay una pequeña subpoblación de neuronas dopaminérgicas. Las neuronas GABA conectan con el tálamo, los colículos superiores y el núcleo pedúnculo pontino, así como con las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta.

La sustancia negra, junto al Área Tegmental Ventral, constituye una unidad anatómico-funcional caracterizada por su proximidad anatómica y por las conexiones que establecen ya que integran la **VÍA NIGROESTRIATAL**. La SN se caracteriza por integrar varios tipos de neuronas: Neuronas dopaminérgicas de tamaño mediano, que contienen melanina y se localizan en SNc, por encima de la SNr; neuronas grandes GABAérgicas, multipolares, detectadas fundamentalmente en la SNr, junto las neuronas multipolares dopaminérgicas de tamaño mediano; interneuronas no dopaminérgicas (Golgi tipo II), de tamaño pequeño, suponen un 10% de las neuronas SNc, pero también aparecen en la SNr. El área tegmental ventral contiene una mezcla de neuronas no dopaminérgicas (20%) y de neuronas dopaminérgicas (80%) (Swanson, 1982). La SN lateral posee neuronas dopaminérgicas de tamaño medio similares a las de la SNc de tamaño medio y grande, y un pequeño porcentaje tienen morfología similar a la SNr.

III. NEUROTRANSMISORES Y RECEPTORES.

Los principales neurotransmisores y receptores, que intervienen en el circuito motor, integrado por la corteza cerebral, los ganglios basales, tálamo y núcleo subtalámico son los siguientes:

1. Neurotransmisor GABA.

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central y abunda en los ganglios basales, hipotálamo, hipocampo y en la médula espinal. La disminución de la actividad de las aferencias dopaminérgicas que llegan al estriado, característica de la Enfermedad de Parkinson, induce un incremento de la descarga inhibitoria de los ganglios basales sobre el tálamo (Chesslet y col., 1996). Las acciones de este neurotransmisor están mediadas por dos clases de receptores diferenciados estructural y farmacológicamente, el receptor GABA A y GABA B.

1.1. Receptor GABA A: Pertenece a la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando. Se ensamblan a partir de una familia de 21 subunidades de genes (α 1-6, β 1-4, γ 1-4, δ , ϵ , π , θ , ρ 1-3) que forman canales de cloro heteroligoméricos. Los receptores funcionales están formados por el ensamblaje de subunidades α y β , mientras que las subunidades γ son necesarias para la formación del sitio de unión a moduladores alostéricos tales como las benzodiazepinas (BZD). Los subtipos de receptores GABA A más abundantes son los siguientes: α 1 β 2 γ 2 (60%); α 2 β 3 γ 2 (15-20%) y α 3 β x γ 2 (10-15%). Estos receptores son mayoritariamente postsinápticos.

1.2. Receptor GABA B: Pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y tienen una gran homología con los receptores glutamato metabotrópicos. También pueden estar acoplados a canales de potasio o calcio inhibiendo la producción de AMPc. Un receptor GABA B funcional está integrado por la dimerización de dos subunidades homólogas (GBR 1 y GBR 2). Estudios recientes indican que GBR1 lleva el sitio de unión al ligando y que GBR 2 está acoplado a proteínas G.

2. Neurotransmisor Glutamato.

El glutamato es el aminoácido excitador por excelencia y está distribuido por los circuitos tálamocorticales de los ganglios basales. Los receptores pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos. Se distinguen, al menos, tres tipos de receptores glutamato ionotrópicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA) y el Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolapropiónico (AMPA). Parece que los receptores NMDA residen principalmente en las neuronas eferentes GABAérgicas de la vía estriatonigral, y están asociados a canales de calcio, mientras que los receptores KA y AMPA están asociados a canales de potasio y sodio. También se han identificado 4 subtipos de receptores glutamato metabotrópicos en el estriado (mGluR1-mGluR4).

Las principales vías glutamatérgicas son córticocorticales, conexiones entre el tálamo y la corteza, y proyecciones que van de la corteza al estriado y a la médula espinal. El hipocampo y el cerebelo también contienen muchas neuronas glutamatérgicas.

3. Neurotransmisor Acetilcolina.

La acetilcolina es el neurotransmisor fundamental de las neuronas motoras bulboespinales, las fibras preganglionares autónomas, las fibras colinérgicas postganglionares (parasimpáticas), y muchos grupos neuronales del sistema nervioso central como las neuronas de proyección e interneuronas que modulan la actividad de las neuronas GABAérgicas del estriado en los ganglios basales. La acetilcolina actúa a través de sus receptores muscarínicos y nicotínicos.

4. Neurotransmisor Dopamina.

La dopamina es un precursor inmediato de la adrenalina y noradrenalina, y es sintetizada a partir del aminoácido tirosina que, por acción de la enzima tirosina hidroxilasa es hidroxilada para convertirse en el metabolito L-Dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que posteriormente es decarboxilada por la DOPA-decarboxilasa para generar dopamina (figura 7A). Posteriormente, la dopamina puede ser metabolizada a noradrenalina en las células que sintetizan la enzima dopamina- β -hidroxilasa y/o catabolizada para generar como producto final ácido homovanílico (figura 7B).

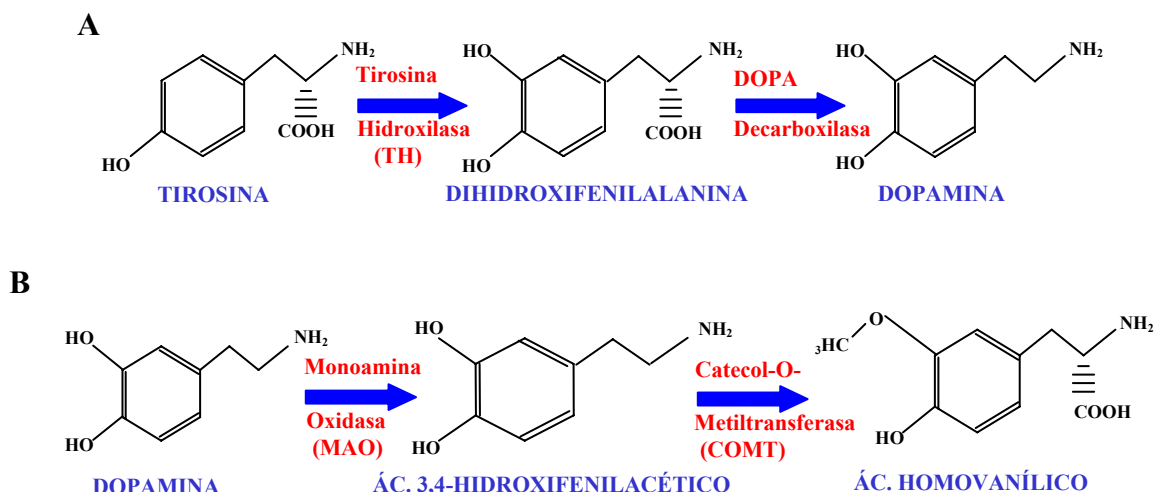


Figura 7. Rutas anabólica (A) y catabólica (B) del metabolismo de la Dopamina.

Igual que el resto de las catecolaminas, la dopamina puede ser recaptada por las neuronas y catabolizada mediante las enzimas monoamina oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT), para generar 3,4-ácido dihidrofenilacético y 3-metoxitiramina, respectivamente, siendo el producto final de esta ruta catabólica la formación del ácido 3-metoxi-4hidroxi-fenilacético (ácido homovanílico) (figura 7B).

La dopamina es un neurotransmisor implicado en el control motor y emocional. A pesar del gran número de funciones importantes que realiza, este mensajero químico se encuentra en pequeñas cantidades dentro de las células del cerebro (en la corteza hay unos 10 billones de neuronas, mientras que en todo el cerebro hay un millón de neuronas dopaminérgicas).

Aunque hay pocas células dopaminérgicas, están dispersas en los principales circuitos neuronales. Uno de ellos es el tracto nigroestriatal que comienza en la sustancia negra y se extiende al caudado y putamen estando implicado en los movimientos finos; la degeneración de estas neuronas está asociada a la sintomatología característica del Parkinson (temblores, rigidez, inestabilidad postural y lentitud de movimientos). También es sintetizada por las neuronas del área tegmental ventral, las cuales proyectan a la corteza prefrontal y al prosencéfalo basal, incluido el núcleo accumbens. Otra proyección dopaminérgica es la que procede del hipocampo y regula la liberación de prolactina hipofisaria.

Se han identificado seis receptores dopaminérgicos, denominados D1, D2a, D2b, D3, D4 y D5. Son metabotrópicos y se agrupan en dos subfamilias (Sibley y col., 1992):

4.1. Subgrupo D1: Incluye los receptores D1a, D1b, D5.

Estos son abundantes en el caudado y putamen, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio, corteza cerebral, sistema límbico, hipotálamo, tálamo (Mengod y col., 1989) y en los axones nigroestriales de la parte reticular de la sustancia negra (Ariano, 1989). La activación de los receptores D1 incrementa la expresión de genes tempranos inmediatos en el estriado así como la conductancia a través de los receptores NMDA. A pesar del efecto opuesto de los receptores D1 y D2 sobre la actividad adenilato ciclasa, algunos efectos de los receptores D1 dependen de la acción sinérgica de los receptores D1 y D2 (LaHoste y col., 2000); esta acción sinérgica resulta de la interacción entre distintas neuronas, ya que los receptores D1 y D2 normalmente no se expresan en las mismas células (Gerfen y col., 1995).

Los receptores D5 se expresan en el hipocampo, hipotálamo y núcleo pretectal (Ciliax y col., 2000; Meador-Woodruff y col., 1992). La dopamina es diez veces más potente sobre los receptores D5 respecto a los receptores D1.

4.2. Subgrupo D2: Incluye los receptores D2, D3 y D4.

Los receptores D2 se expresan fundamentalmente a nivel postsináptico en el caudado y putamen, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio (Mengod y col., 1989) y actúan como autorreceptores en la superficie de los axones dopaminérgicos en la mayor parte del sistema nervioso central, a excepción del área tegmental ventral (Akaoka y col., 1992).

Los receptores D3 se expresan en el tubérculo olfatorio, núcleo accumbens, isla de Calleja e hipotálamo, y actúan como autorreceptores en las células dopaminérgicas que integran las proyecciones que conectan la sustancia negra y el área tegmental ventral (Bouthenet y col., 1991). Los receptores D3 se localizan fundamentalmente en el área límbica, afectando a la locomoción y quizás al refuerzo y recompensa (Shafer y Levant, 1998).

Los receptores D4 están presentes en la corteza frontal, la amígdala y la médula espinal (Van Tol y col., 1991). Su afinidad no sólo se limita a la dopamina, sino que también se unen a la adrenalina y a la noradrenalina.

Entre todos los receptores dopaminérgicos, sólo D2 y D3 se expresan sinápticamente. La regulación de la liberación de dopamina es modulada principalmente por autorreceptores D3, mientras que la regulación de la biosíntesis y metabolismo dopaminérgico está mediado por los autorreceptores D2 (Raevski, 1998).

La lesión de la vía nigroestriatal provoca cambios en el sistema dopaminérgico que afectan tanto a nivel presináptico como postsináptico, que van desde el incremento de la síntesis y liberación de dopamina (Castañeda y col., 1990; Robinson y col., 1994a, 1994b; Zhang y col., 1988) al incremento de respuesta a la dopamina por aumentar la expresión de los receptores dopaminérgicos (Hipersensibilidad postsináptica) (LaHoste y Marshall, 1992; Stauton y col., 1981; Ungerstedt 1971a), lo cual tiene una gran repercusión en el comportamiento motor. Así, cuando se administra anfetamina (Hefti y col., 1980a, 1980b) (incrementa el contenido de dopamina a nivel sináptico, ya que induce la liberación e inhibe la recaptación del neurotransmisor en las terminales axonales) se provoca la rotación ipsilateral (figura 8), ya que actúa en mayor grado en el lado por poseer más terminales dopaminérgicas. Por otro lado, la apomorfina (agonista mixto de los receptores D1 y D2) (figura 8) induce la rotación contralateral a la lesión, lo que indica que la denervación es más sensible a la droga (Creese y col., 1977; Ungerstedt, 1971b), posiblemente al incrementarse la expresión de los receptores dopaminérgicos D2 (Ungerstedt 1971b; Creese y col., 1977; Neve y col., 1982; Stauton y col., 1981; Waddington y col., 1979) y/o al producirse el desequilibrio sinérgico de los receptores D1 y D2 (LaHoste y Marshall, 1992; Trugman y James, 1989; Winkler y Weiss, 1989).

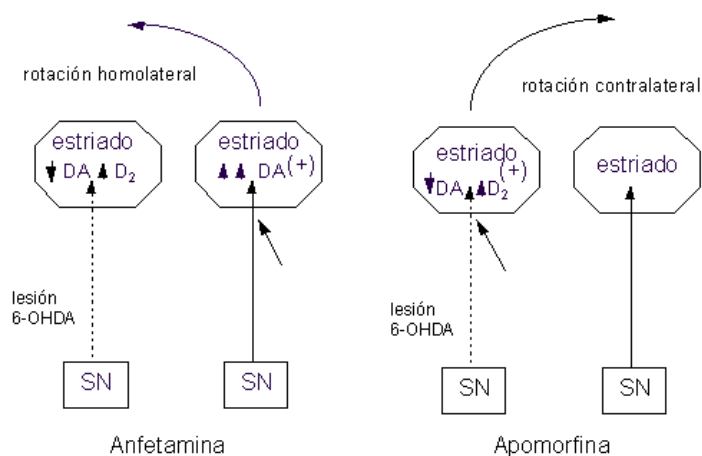


Figura 8. Efecto de la administración de apomorfina y de la anfetamina sobre el comportamiento motor tras inducir una lesión unilateral en el sistema nigroestriatal del hemisferio izquierdo cerebral. DA, dopamina; D₂, receptor dopaminérgico; SN, sustancia negra.

IV. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer, con una incidencia de 20 casos por cada 100.000 habitantes y una prevalencia de 150/100.000 habitantes. Aunque la incidencia aumenta con la edad, un 15% de los casos se diagnostican antes de los 40 años.

Las manifestaciones clínicas motoras aparecen cuando se han destruido más del 80% de las neuronas productoras de dopamina de la parte compacta de la sustancia negra (SNc). También degeneran, si bien en menor medida, las neuronas productoras de dopamina de otras áreas encefálicas como el neocórtex, sistema límbico, hipotálamo, e incluso, la retina. Los síntomas característicos de la enfermedad son el temblor, típicamente de reposo, pero también de acción, en las extremidades y en la mandíbula, la rigidez en el cuello y las extremidades, la bradicinesia o lentitud de movimientos y, de forma más tardía, la alteración de los reflejos posturales. Estos síntomas ocurren de forma asimétrica, y esta asimetría se manifiesta durante todo el curso de la enfermedad.

Además de las neuronas dopaminérgicas, en la EP hay pérdida de otras poblaciones neuronales como las neuronas dopaminérgicas del locus coeruleus, las serotoninérgicas de los núcleos rafe, o las colinérgicas del núcleo basal de Meynert y del núcleo pedunculopontino (Agid y col., 1987; Jellinger, 1990). También disminuyen las cantidades de neuropéptidos como la sustancia P y la encefalina en la SNc y en el estriado y la somatostatina en la corteza frontal y en el hipocampo.

En las áreas afectadas no solo se observa pérdida neuronal, sino también, salvo en la EP causada por mutación de la *parking*, unas inclusiones proteicas intracitoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy, muy características, aunque no patonómicas, de la EP.

En la actualidad se cree que la EP no se explica por una única etiología. Es probable, incluso, que represente un conjunto de enfermedades. En los últimos años se han considerado tanto factores genéticos (mutaciones en el ADN nuclear como mitocondrial), ambientales (toxinas o pesticidas), cuyo efecto individual o combinado da lugar a la degeneración neuronal característica de la EP.

1. Tratamiento.

Las diferentes terapias empleadas en la actualidad en el tratamiento de la EP son sintomáticas. A algunas de ellas (agonistas dopaminérgicos, IMAOs) se han atribuido efectos protectores neuronales, pero aún no hay evidencias firmes.

1.1. El tratamiento farmacológico se basa en la terapia sustitutiva de la dopamina. Como esta sustancia no atraviesa la barrera hematoencefálica y presenta efectos secundarios vasculares importantes, se han diseñado otras estrategias. El medicamento con efecto sintomático más potente es la levodopa, que se administra con un inhibidor periférico de la dopa decarboxilasa, para disminuir el metabolismo periférico. La levodopa atraviesa la barrera y se transforma en dopamina. Se puede aumentar su acción añadiendo inhibidores de las otras enzimas que la metabolizan, la catecolortometiltransferasa (COMT) o la monoaminoxidasa (MAO). La otra estrategia consiste en la estimulación directa de los receptores dopaminérgicos de las neuronas del estriado, mediante los agonistas dopaminérgicos.

1.2. El tratamiento quirúrgico consiste en la inhibición de la actividad, aumentada patológicamente en la EP, del núcleo subtalámico (NST) o del globo pálido interno, mediante ablación o estimulación continua mediante la colocación de una electrodo. La estimulación del NST es la técnica más empleada en la actualidad.

1.3. Implantación de células productoras de dopamina: se han realizado implantes de mesencéfalo fetal, células retinianas, médula adrenal o cuerpo carotídeo. En algunos casos se ha demostrado supervivencia de las células implantadas y establecimiento de sinapsis, pero la correlación clínica ha sido pobre en la mayoría de los casos.

1.4. Administración de GDNF: GDNF es un factor neurotrófico descubierto por sus propiedades dopaminotróficas en 1993 (Lin y col. 1993) que induce la supervivencia neuronal dopaminérgica in vitro (Hurelbrink y Baker, 2001). La inyección directa de GDNF o las técnicas de terapia génica productoras del factor neurotrófico en distintas localizaciones concretas del cerebro, demuestran que GDNF tiene tanto efectos protectores (cuando se administra antes de lesionar) como reparadores (cuando se administra después de lesionar).

1.4.1. Inyección de GDNF Recombinante: la administración intraestriatal, intranigral o intracerebroventricular de GDNF incrementa la supervivencia celular, el crecimiento de las fibras dopaminérgicas y mejora el comportamiento motor en los modelos de rata parkinsoniana (Aoi y col., 2000; Aoi y col., 2001; Kirik y col., 2000; Opacka-Juffru y col., 1995; Tomac y col. 1995); estos efectos positivos de GDNF también se detectan en modelos de primates no humanos parkinsonianos (Costa y col., 2001; Gash y col., 1996; Gerhardt y col., 1999; Grondin y col., 2002; Iravani y col., 2001).

1.4.2. Terapia Génica *Ex Vivo*:

1.4.2.1. Secreción de GDNF por células manipuladas genéticamente y encapsuladas: El trasplante de células manipuladas genéticamente para liberar factores neurotróficos de forma continuada y directa al cerebro supone una nueva alternativa terapéutica que también incrementa el grado de desarrollo o ramificación de las fibras dopaminérgicas (Lindner y col., 1995; Date y col., 2001) y provoca ciertas mejoras en el comportamiento (Shingo y col., 2002; Tseng y col., 1997).

1.4.2.2. El implante de células tales como fibroblastos, células de carcinoma P19 o astrocitos secretores de GDNF, también previene la muerte neuronal dopaminérgica tras inducir una lesión (Akerud y col., 1999; Cunningham y Su, 2002; Nakao y col., 2000).

1.4.2.3. También se han implantado microesferas liberadoras de GDNF, células madre neurales (células embrionarias pluripotenciales aisladas de la capa celular interna del blastocisto) manipuladas genéticamente o células de médula ósea transducidas con GDNF, con el fin de producir el factor neurotrófico para mejorar el comportamiento e incluso prevenir la degeneración dopaminérgica (Akerud y col., 2001; Gouhier y col., 2002; Park y col., 2001).

1.4.3. Terapia Génica *In Vivo* (Vectores Virales):

La producción de GDNF mediada por vectores virales permite la liberación de moléculas neuroprotectoras a largo plazo ya que permite integrar el gen del factor neurotrófico de forma estable en los cromosomas de las células ya diferenciadas como las neuronas (Blomer y col., 1997; Trono, 2000). Son varios los tipos de vectores virales que se han estudiado: adenovirales,

adenoasociados y lentivirales. De todos ellos, parece que los lentivirus podrían representar la mejor alternativa terapéutica en el tratamiento del Parkinson en seres humanos (Kordower, 2003), ya que se integran principalmente dentro de las células que ya no se dividen, y expresan el transgen de GNDF de forma casi inmediata, y a largo plazo, protegiendo a las neuronas dopaminérgicas como también se vio en los modelos de roedores y monos Rhesus parkinsonianos; en el caso de primates, incluso se detectó un incremento en el número de células dopaminérgicas (Palfi y col., 2002).

2. Modelos experimentales de Parkinson.

La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra y la disminución del contenido de dopamina en el estriado, representan las características histológicas y neuroquímicas más importantes de la enfermedad de Parkinson. Por ello, el desarrollo de modelos animales de Parkinson también se ha basado en inducir alteraciones estructurales y funcionales en la transmisión dopaminérgica de la vía nigroestriatal. Como modelos que son, ninguno de ellos es un fiel reflejo de lo que representa la enfermedad de Parkinson desde el punto de vista motor, histológico o neuroquímico, pero son de gran utilidad para el estudio molecular, estructural y funcional de los ganglios basales (en estado normal o patológico), y de la eficacia de posibles tratamientos antiparkinsonianos.

2.1. Modelo experimental con 6-Hidroxidopamina (6-OHDA).

6-OHDA es una amina tóxica, ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de Parkinson en roedores. Cuando es administrada por vía sistémica, destruye las neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos pero carece de acción tóxica a nivel del sistema nervioso central, ya que no puede atravesar la barrera hematoencefálica. La inyección intracerebral de 6-OHDA produce la destrucción selectiva de las neuronas catecolaminérgicas gracias a su gran afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas. Ungerstedt en 1968 describió por primera vez que la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el haz nigroestriatal inducía una lesión selectiva y directa de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.

Aunque existen evidencias sobre los múltiples efectos de 6-OHDA sobre el metabolismo neuronal (Heikkila y Cohen, 1972; Liang y col. 1975; Wagner y Trendelenburg, 1971), su

acción está ligada fundamentalmente a la formación de H_2O_2 y radicales libres tipo hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (figura 9); además, 6-OHDA también puede ser captada de forma exclusiva por el transportador de aminas localizado en la membrana axonal, para transportarla retrógradamente hacia el soma de las neuronas catecolaminérgicas, donde actúa inactivando la liberación de catecolaminas. La secuencia temporal de procesos degenerativos en las neuronas dopaminérgicas va desde la desaparición de los depósitos de catecolaminas, a la pérdida de la capacidad de generar potenciales de acción, y a largo plazo, conlleva la disminución de la expresión de las enzimas implicadas en la biosíntesis catecolaminérgica (tirosina hidroxilasa y dopamina- β -hidroxilasa).

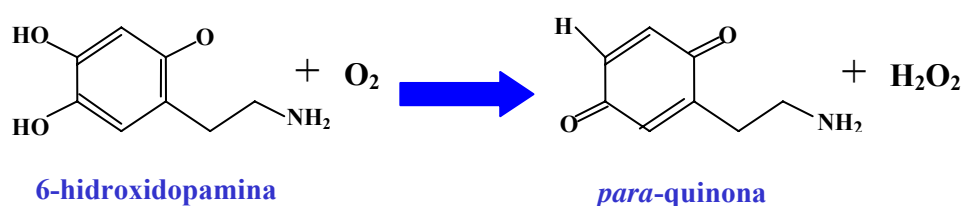


Figura 9. La oxidación de la neurotoxina 6-OHDA genera la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y quinonas, cuyo efecto combinado actúa destruyendo las estructuras catecolaminérgicas.

La inyección de 6-OHDA en el haz nigroestriatal, induce, de forma selectiva, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra que proyectan al estriado y al área tegmental ventral que forma parte del sistema dopaminérgico mesolímbico. El Parkinson es una enfermedad de evolución lenta y progresiva, por lo que uno de los modelos más representativos y más utilizado es aquél en el que se lesiona unilateralmente la vía nigroestriatal, de tal manera que en todo momento se puede hacer un estudio comparativo entre el lado lesionado y el lado control, no lesionado. Esta lesión provoca la degeneración de los somas de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (transporte retrógrado, desde el axón hacia el soma neuronal), así como de sus terminales en el estriado (transporte anterógrado, desde el axón al terminal axonal). Lo que demuestra la existencia de una lesión es la respuesta rotacional a la administración de apomorfina o amfetamina; así, la amfetamina incrementa los niveles sinápticos de dopamina por inducir su liberación e inhibir su recaptación por los terminales nerviosos, generando rotaciones ipsilaterales paralelas a un incremento de la actividad dopaminérgica en el lado no lesionado. Por otro lado, la apomorfina (agonista del receptor dopaminérgico) estimula directamente los receptores de dopamina preferentemente en

el lado lesionado, provocando un incremento de la respuesta a la dopamina que induce la rotación contralateral.

2.2. Modelo experimental con MPTP (1-Metil-4-fenil-1,2,3,4 tetrahidropiridina).

Posteriormente a 6-OHDA, se descubrió una nueva neurotoxina más específica para las neuronas dopaminérgicas, que resultó ser un componente de la heroína sintética (Langston y col., 1983), 1-Metil-4-fenil-1,2,3,4-terahidropiridona o MPTP. No todas las especies animales presentan la misma sensibilidad a MPTP; así, por ejemplo, mientras los primates desarrollan trastornos motores casi idénticos a la enfermedad de Parkinson, en humanos y otras especies tales como la rata, cobaya y conejo, se aprecia una gran resistencia a la toxina; su metabolito MPP⁺, es un potente tóxico que destruye las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra cuando ésta se administra en el estriado. En principio se pensó que la lesión con MPTP afectaba de forma exclusiva a la población de neuronas dopaminérgica de la parte compacta de la sustancia negra, no obstante, diversos autores demostraron en macacos viejos, que la administración de MPTP inducía la degeneración adicional, aunque en menor grado, de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y del locus coeruleus, donde también se han observado cuerpos de inclusión análogos a los cuerpos de Lewy presentes en humanos con Parkinson.

V. LOS FACTORES NEUROTROFICOS.

Los factores neurotróficos son péptidos de secreción que promueven la supervivencia neuronal, estimulan el crecimiento neuronal e influyen en el establecimiento de contactos sinápticos durante el desarrollo. Los axones en crecimiento compiten por cantidades limitadas de factores neurotróficos, y en aquellos en los que no se obtiene suficiente cantidad se produce la muerte celular programada o apoptosis (Connor y col. 1997; Kaal y col., 1997; Connor y col., 1998; Thoenen y col., 1987). Además, en la etapa adulta, los factores neurotróficos son necesarios para mantener las funciones neuronales y el fenotipo neuronal específico (Blesch y col., 1998). Estos factores están sometidos a un transporte anterógrado (Altar y Distefano, 1998; Mufson y col., 1999) y/o retrógrado, actuando mediante mecanismos paracrinós o autocrínos sobre la población neuronal y glial (Yuen y col., 1996).

La relevancia de estos factores en la supervivencia y diferenciación fenotípica de las neuronas en desarrollo, así como en el mantenimiento y protección de las neuronas maduras en el sistema nervioso de vertebrados está bien documentado (Connor y col., 1998; Ebadi y col., 1997). La carencia de apoyo trófico endógeno para ciertas poblaciones neuronales debido a cambios en la expresión génica de estos factores o de sus receptores, puede conducir a la degeneración neuronal característica de trastornos como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson (Connor y col., 1998). Numerosos trabajos indican que la administración de los factores neurotróficos posee un efecto inhibitorio en el avance de los procesos neurodegenerativos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Bowers y col., 1997).

Los factores neurotróficos se clasifican en varias familias de moléculas relacionadas estructural y funcionalmente (Davies, 2003). Una de estas familias es la de GDNF, la cual se caracteriza por mediar sus acciones a través del complejo receptor integrado por Ret tirosín kinasa y el receptor de la familia de GDNF o GFR α .

1. Familia de Factor Neurotrófico derivado de la Glia o GDNF.

Los ligandos de la Familia de GDNF (*GFLs*) son sintetizados y secretados en una gran variedad de tejidos, y unen a sus receptores sobre células diana específicas, influyendo así en su desarrollo, supervivencia y en el manteniendo del fenotipo diferenciado en la etapa adulta (Airaksinen y col. 1999). Los ligandos pertenecientes a esta familia son Factor Neurotrófico Derivado de la Glia (*GDNF*), Neurturina (*NRTN*), Artemina (*ARTN*) y Persefina (*PSPN*) (Baloh y col., 2000). Estas proteínas de secreción se generan en forma de moléculas precursoras preproGFL, cuya secuencia señal se escinde para luego ser secretadas, y finalmente activadas mediante un corte proteolítico.

2. Factor Neurotrófico derivado de la Glia (GDNF).

2.1. Estructura.

GDNF es una proteína homodimérica y glicosilada (Lin y col., 1993) unida mediante puentes disulfuro. El peso molecular del homodímero es de aproximadamente 33-45 kD, mientras que cada monómero tiene un peso de 16 kD tras ser deglicosilada (Lin y col., 1993, 1994). Hay una gran homología en la secuencia proteica (93%) entre la especie humana y de rata (Lin y col., 1993).

La región codificadora del gen de GDNF se traduce inicialmente en un precursor polipeptídico de 211 aminoácidos. No obstante, existe una forma de procesamiento alternativo del ARN de GDNF que genera una delección de 78 pb, como se observó en estudios de PCR realizados tanto en tejido humano como de rata (Schaar y col., 1993; Choi-Lundberg y Bohn, 1995). Además, parece que esta región deleccionada se encuentra en la secuencia de la preproteína, entre la señal de secreción y la secuencia consenso para el procesamiento proteolítico sin afectar a la región codificadora de la proteína madura de GDNF (Choi-Lundberg y Bohn, 1995). En cualquier caso, tanto el transcrito de GDNF como el de su forma deleccionada generan la misma proteína madura de 134 aminoácidos, y se desconoce la relevancia del procesamiento diferencial.

GDNF también se caracteriza por conservar en su estructura siete residuos cisteína que se disponen prácticamente en el mismo orden espacial (Ibáñez, 1998) que los miembros de la superfamilia del TGF- β , lo que hace que también se clasifique dentro de esta superfamilia.

2.2. Complejo Receptor de GDNF.

Todos los ligandos de la familia de GDNF señalizan a través del receptor Ret Tirosín Kinasa, el cual fue descubierto como protooncogen. Se activa cuando su ligando se une primero a un grupo de proteínas ya mencionadas, los receptores GFR α . Se han caracterizado cuatro tipos de GFR α (*GFR α 1-4*), los cuales determinan la especificidad de unión al ligando del complejo GFR α -Ret. El GDNF une a GFR α 1, y entonces forma un complejo con Ret. NRTN une a GFR α 2, ARTN a GFR α 3 y PSPN activa a Ret tras unirse a GFR α 4. GDNF, NRTN y ARTN también pueden ser reconocidos por otros receptores GFR α , mientras que PSPN, únicamente puede ser reconocido por GFR α 4 (Airaksinen y col., 1999; Baloh y col., 2000; Takahashi, 2001; Paratcha y col., 2001) (figura 10).

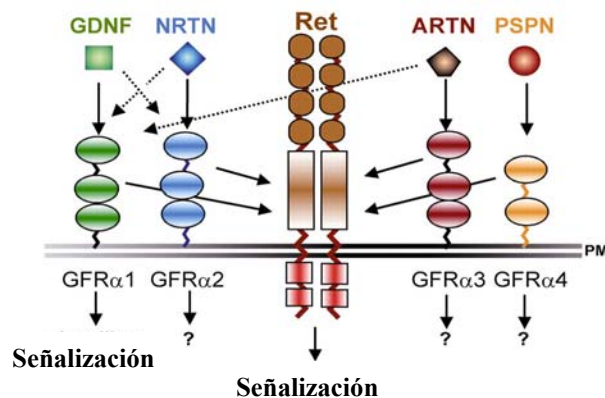


Figura 10. Interacción de los ligandos de la familia de GDNF (GFLs) con sus receptores. Todos los GFLs activan al receptor Ret tirosín kinasa a través de los receptores GFR α . Las flechas con línea continua muestran la interacción ligando-receptor preferente. Las proteínas GFR α se unen a la membrana plasmática a través de su interacción con glucosilfosfatidilinositoles (GPI) y consisten en tres dominios globulares ricos en cisteína (excepto GFR α 4 que tiene dos).

Los receptores GFR α generalmente están anclados a la membrana plasmática, pero también existen formas solubles (Paratcha y col., 2001), ya sea indirectamente por acción de una fosfolipasa o proteasa que libera al receptor de la balsa lipídica, o en el caso del GFR α 4 (Lindahl y col., 2000), por el procesamiento alternativo del ARN que da lugar a la aparición de formas solubles.

Ret es una proteína transmembrana que contiene cuatro repeticiones de la proteína cadherina en el dominio extracelular y el típico dominio tirosín kinasa intracelular. La Figura 13 describe el modelo de interacción de GDNF, GFR α y Ret y la consiguiente activación del dominio tirosín kinasa intracelular de Ret. En primer lugar se produce la unión del dímero de GDNF al GFR α , tanto en su forma monomérica como dimérica. No se sabe si el GFR α dimérico está en equilibrio con su forma monomérica en ausencia de GDNF, o si la dimerización es inducida por la unión de GDNF. Lo que sí parece estar claro es que se considera que está activo cuando el complejo de señalización consiste en un dímero de GDNF y dos moléculas de GFR α unidas a dos moléculas de Ret, induciéndose la autofosforilación en un residuo de tirosina (Airaksinen y col., 1999) (figura 11). No obstante, se ha visto que mutantes de GDNF deficientes en GFR α 1 siguen siendo capaces de activar Ret, lo que indica que al menos algunas moléculas de Ret están asociadas con GFR α 1 antes de interaccionar con GDNF (Eketjäll y col., 1999).

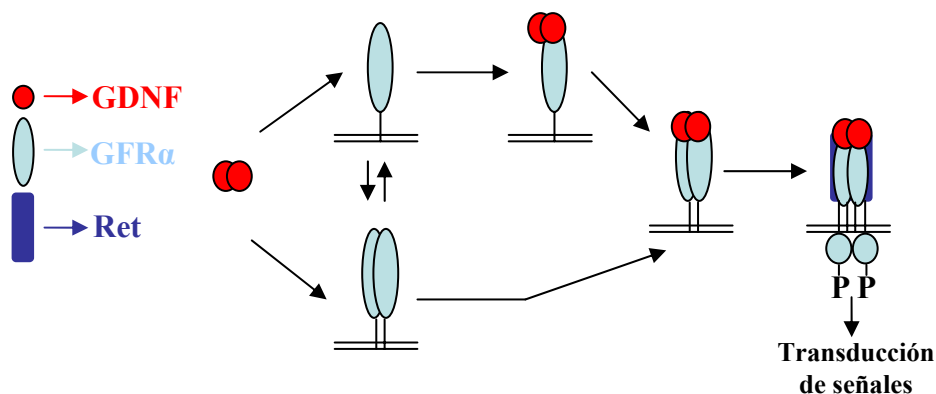


Figura 11. Modelo de señalización de GDNF mediado por GFR α y Ret.

También se ha demostrado que GDNF puede activar cascadas de señalización intracelulares independientemente de Ret, a través de GFR α 1, induciendo la activación de SFKs y la consiguiente fosforilación de MAPK (supervivencia celular y neuritogénesis), PLC- γ

(estimulación de la neurotransmisión), proteínas de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), así como la inducción de c-fos (Poteryaev y col., 1999; Trupp y col., 1999) y de kinasas Fyn y FAK que promueven la migración neuronal y el crecimiento de las neuritas (Paratcha y col., 2003). Además, GDNF también puede inducir la fosforilación de otras tirosín kinasas como MET (Popsueva y col., 2003), implicada en la tubulogénesis renal.

Por otro lado, en ausencia del ligando GDNF, el receptor Ret induce la muerte celular por apoptosis, y ésta será bloqueada cuando nuevamente el complejo receptor interactúe con el ligando. Esta actividad proapoptótica de Ret es potenciada al interactuar con GFR α 1, lo cual indica que Ret y GFR α 1 también son capaces de formar un complejo activo en ausencia de GDNF (Pezeshki y col., 2001) dependiente de la activación de caspasas e independiente de la actividad kinasa de Ret.

2.3. Función y Ontogenia.

Los factores neurotróficos, entre ellos GDNF, son producidos por distintos tipos de células diana (neuronales o no neuronales) invadidas por subpoblaciones de neuronas que precisan de este apoyo trófico para sobrevivir. Estos factores secretados por las células diana, interactúan con su receptor en la superficie de la membrana neuronal (en los terminales axonales, a lo largo del axón o en el soma neuronal), se internalizan y finalmente se transportan anterógrada (Russell y col., 2000) o retrógradamente (Laurikainen y col., 2000; Leitner y col., 1999) según corresponda, para activar la cascada de señales que induce la supervivencia celular. Un esquema general es el que se observa en la figura 12, donde se aprecian las distintas rutas por las que los factores neurotróficos inducen la supervivencia neuronal, así como el tipo de células diana secretoras del apoyo trófico. Las neuronas pueden obtener apoyo trófico a partir de distintas fuentes:

- Células diana neuronales o no neuronales. En este caso, las neuronas del grupo A secretan el factor neurotrófico que une a su receptor en las terminales axonales de las neuronas B, se internaliza y transporta retrógradamente (flecha roja).
- Células intermediarias a las células diana y células gliales asociadas a los axones de las neuronas B. En este caso el factor neurotrófico es transportado retrógradamente según la dirección de las flechas azules.

- Fibras aferentes. Según el esquema, los factores neurotróficos se sintetizan en el cuerpo celular de las neuronas del grupo C y se transportan anterógradamente (flecha verde) a lo largo de los axones de estas neuronas para ser finalmente liberados desde sus terminales e interactuar postsinápticamente con los receptores que se expresan la superficie de la membrana de los somas o dendritas de las neuronas del grupo B.
- Autocrina (flecha púrpura).

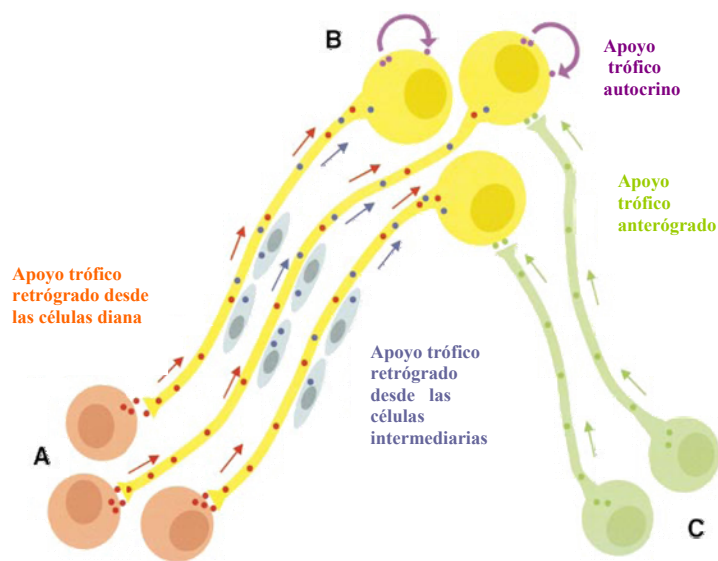


Figura 12. Esquema representativo de las rutas por las que los factores neurotróficos inducen la supervivencia celular. Se muestran tres tipos de neuronas (A, B y C), las posibles conexiones que se pueden establecer entre ellas y la fuente de obtención del apoyo trófico.

El factor GDNF afecta específicamente a las neuronas dopaminérgicas, induciendo su supervivencia, diferenciación (tamaño del soma y longitud de la neurita) e incrementando la recaptación de dopamina en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Lin y col., 1993). Además, GDNF induce la supervivencia de otras poblaciones neuronales tales como las noradrenérgicas, serotoninérgicas del núcleo rafe, colinérgicas, o las células de Purkinje. Este factor también afecta a las motoneuronas, ya que cuando se administra a las neuronas en cultivo, incrementa su supervivencia, el desarrollo de la neurita y la actividad colina acetiltransferasa (Henderson y col., 1994). Todo esto hace que GDNF también ejerza un papel protector y/o reparador sobre distintas poblaciones neuronales lesionadas con agentes químicos

como las neurotoxinas 6-OHDA o MPTP (Connor, 2001; Akerud y col., 2001; Wang y col., 2001; Rosenbland y col., 2000; Aoi y col., 2000; Kirik y col., 2000; Choi-Lundberg y col., 1997, 1998), la pilocarpina inductora de estados epilépticos (Schmidt-Kastner y col., 1994) y el ácido kaínico (Humpel y col., 1994), o bien, lesionadas mecánicamente (Abe y Hayashi, 1997; Trupp y col., 1995; Hammarberg y col., 1996). Las motoneuronas pueden ser rescatadas de la muerte natural o inducida (Henderson y col., 1994; Oppenheim y col., 1995) a partir de animales en distintas etapas de desarrollo (Li y col., 1995; Yan y col., 1995), lo cual posibilita la aplicabilidad del factor GDNF como potencial agente terapéutico en trastornos neuronales motores tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal o en casos de isquemia o lesión mecánica de la médula espinal.

La expresión del gen de GDNF (mediante técnicas como la RT-PCR, hibridación in situ o inmunohistoquímica) no sólo se detecta en distintas regiones del sistema nervioso central de individuos en distintas etapas en desarrollo (Schaar y col., 1993; Strömberg y col., 1993; Springer y col., 1994; Choi-Lundberg y Bohn, 1995; Nosrat y col., 1996; Polchon y col., 1997), sino también en tejidos periféricos (Nosrat y col., 1996) tales como el tracto gastrointestinal, metanefros, donde juega un papel esencial en la nefrogénesis, diferenciación de las células de Sertoli, y en el músculo esquelético y cartílago. No obstante, y casi en cualquier tipo de tejido, la expresión de GDNF es máxima durante la primera semana postnatal (Choi-Lundberg y Bohn, 1995; Cho y col., 2003).

3. OBJETIVOS

En esta tesis propusimos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de la Vitamina D sobre la expresión del Factor Neurotrófico derivado de la Glia (GDNF) en el estriado de ratas tratadas sistémicamente con vitamina D y en cultivos primarios neuronales de estriado.
2. Evaluar el efecto de la neurotoxina 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) sobre la expresión del factor neurotrófico GDNF (ARNm y proteína) y de la proteína tirosina hidroxilasa (TH) (indicativa del grado de degeneración neuronal) en el sistema nigroestriatal, tanto en animales lesionados estereotáxicamente en el haz prosencefálico medial, como en cultivos primarios neuronales de estriado.
3. Evaluar el grado de supervivencia celular en los cultivos neuronales, y los cambios de comportamiento motor observados en los animales tras administrar 6-OHDA.
4. Determinar el efecto de la administración sistémica de Vitamina D antes (efecto pre-lesión) y después (efecto post-lesión) de inyectar estereotáxicamente la neurotoxina 6-OHDA en el haz prosencefálico medial animal respecto a la neurodegeneración inducida por 6-OHDA, valorando los niveles de expresión del factor neurotrófico GDNF y la proteína TH, así como la morfología celular dopaminérgica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES.

Los animales utilizados fueron ratas Sprague-Dawley de distintas edades adquiridas en el animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela, mantenidas en cajas de plástico, en grupos o cajas individuales, a una temperatura de 23 °C, iluminación controlada con ciclos alternativos de 12 horas de luz/oscuridad y alimentadas con pienso comercial y agua de acceso ilimitado. Los protocolos experimentales realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Cuidados Animales e Investigación de la Universidad de Santiago de Compostela.

En este trabajo se utilizaron animales de experimentación de distintas edades:

A. Ratas adultas macho Sprague-Dawley (peso aproximado de 250-300 g al comienzo de los experimentos), a las que se les extrae el estriado (caudado), para luego congelarlo a -80 °C hasta su procesamiento para analizar la expresión del ARNm y de la proteína, o el cerebro entero, que será fijado en formol tamponado para luego hacer el análisis inmunohistoquímico.

B. Ratas neonatales de 3-4 días de edad Sprague-Dawley, a las que se les extrajo el estriado (caudado) para establecer cultivos primarios neuronales, y a partir de ellos el análisis de expresión de ARNm y proteína.

2. TRATAMIENTOS.

2.1. *In vivo*.

2.1.1. Vitamina D: La 1,25(OH)₂D₃ (Calcitriol; *Sigma, St Louis, MO, USA*) se diluyó en etanol absoluto para generar una solución inicial concentrada (10 µg/µl), a partir de la cual se hace una dilución (1µg/kg) que será utilizada como la dosis administrada intraperitonealmente (i.p.) a los animales durante los 7 días que duró el tratamiento. Los animales control recibieron una dosis diaria de etanol absoluto al 50% diluido en solución salina.

2.1.2. Neurotoxina 6-Hidroxidopamina.HCl 100 mg (6-OHDA; *Sigma*): Cada animal fue lesionado unilateralmente en el sistema nigroestriatal, mediante la inyección estereotáxica en

el haz prosencefálico medial de 8 µg de la neurotoxina catecolaminérgica 6-OHDA disueltos en 2 µl de salino fisiológico con 0.02% de ácido ascórbico (*Sigma*).

2.2. *In Vitro*.

2.2.1. Vitamina D: La Vitamina D se disolvió en etanol absoluto, creando una solución de partida 0.001 M, a partir de la cual se hicieron distintas diluciones (1 nM-1 µM) con distintos tiempos de actuación (12 a 72 h), para elegir la dosis y tiempo efectivos del tratamiento.

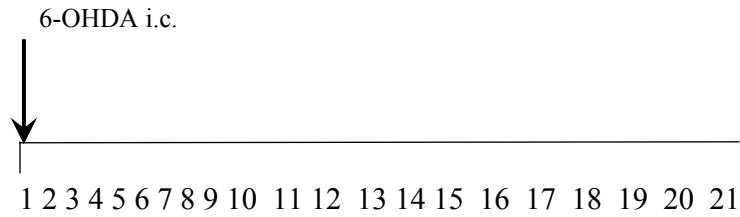
2.2.2. Neurotoxina 6-OHDA: Se elabora una solución concentrada de partida (10 mM) preparada en tampón fosfato salino (PBS; *Sigma*) estéril con ácido ascórbico al 0.1%, que será diluida (50-100 µM) en medio de cultivo antes de ser añadida a las placas de cultivo.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.1. Estudios *in vivo*: Se establecieron 4 grupos experimentales:

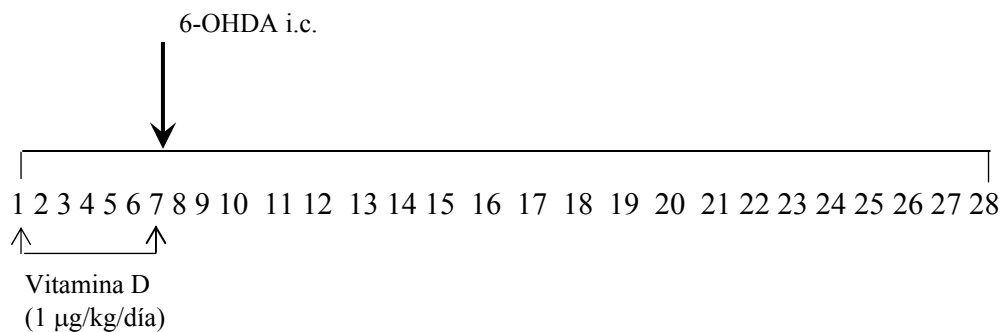
3.1.1. Grupo experimental A.1: *Efecto de la vitamina D administrada intraperitonealmente (i.p.) sobre la expresión de GDNF en el estriado (caudado)*. Para este estudio se emplearon un total de 14 ratas macho adultas con un peso aproximado de 250-300 g que se distribuyeron en dos grupos: Un primer grupo (n=7) sometido al tratamiento agudo con vitamina D inyectada i.p. durante 7 días consecutivos, y un segundo grupo control (n=7), tratado i.p. con salino.

3.1.2. Grupo experimental A.2 (esquema 1): *Efecto de la lesión unilateral (6-OHDA) en el sistema dopaminérgico sobre la expresión de GDNF (ARNm y proteína) y tirosina hidroxilasa (proteína)*. En este estudio se utilizó un grupo de ratas macho adultas de 250-300 g (n=20) inyectadas estereotáxicamente en las fibras nigroestriales del haz prosencefálico medial con la 6-OHDA para generar una lesión parcial de las fibras nigroestriales, durante 21 días. Todos los animales fueron lesionados en el sistema dopaminérgico del hemisferio izquierdo, mientras que el derecho permanece intacto.



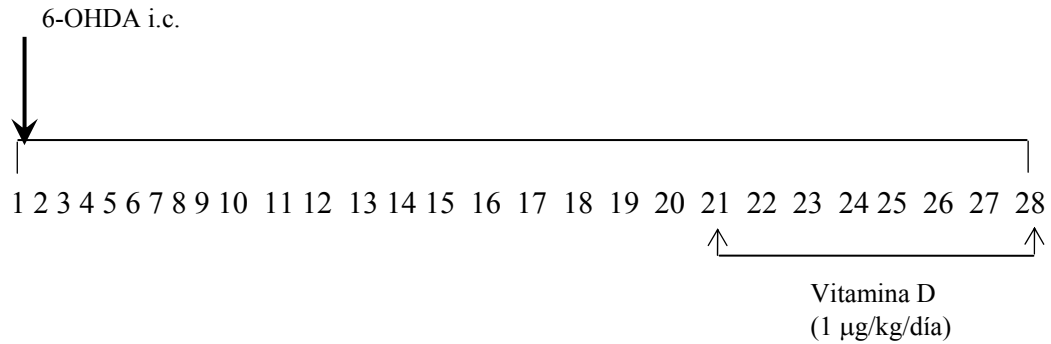
Esquema 1. Diseño experimental del grupo de ratas lesionadas unilateralmente mediante la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (i.c). i.c, intracerebral. (Grupo experimental A.2).

3.1.3. Grupo experimental A.3 (esquema 2): *Efecto de la administración i.p. de vitamina D antes (EFECTO PRE-LESIÓN) de inducir la lesión unilateral (6-OHDA) en las fibras nigroestriatales, sobre la expresión de GDNF (ARNm y proteína) y tirosina hidroxilasa (proteína).* Se utilizó un grupo de ratas macho adultas de 250-300 g (n=20), pretratadas con vitamina D i.p. durante 7 días, y a continuación lesionadas, hasta hacer 21 días. Todos los animales fueron lesionados con 6-OHDA en el sistema dopaminérgico del hemisferio izquierdo, mientras que el derecho permanece intacto.



Esquema 2. Diseño experimental del grupo pretratado i.p. con vitamina D, y posteriormente lesionado unilateralmente mediante la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (i.c). i.p., intraperitoneal; i.c, intracerebral. (Grupo experimental A.3).

3.1.4. Grupo experimental A.4 (esquema 3): *Efecto de la administración i.p. de la vitamina D después (EFECTO POST-LESIÓN) de inducir la lesión unilateral (6-OHDA) en las fibras nigroestriatales, sobre la expresión de GDNF (ARNm y proteína) y tirosina hidroxilasa (proteína).* En este estudio se empleó un grupo de ratas macho adultas de 250-300 g (n=19) que fueron lesionadas con 6-OHDA en el haz prosencefálico medial, y a los 21 días, tratadas con la vitamina D durante 7 días. Todos los animales fueron lesionados en el sistema dopaminérgico del hemisferio izquierdo, mientras que el derecho permanece intacto.



Esquema 3. Diseño experimental del grupo lesionado unilateralmente mediante la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (i.c), y a continuación tratado i.p. con la vitamina D. i.c, intracerebral; i.p., intraperitoneal. (Grupo experimental A.4).

3.1.5. Grupo experimental A.5: *Efecto de la simulación de la lesión unilateral (ácido ascórbico 0.02%) del sistema dopaminérgico sobre la expresión de GDNF (ARNm y proteína) y tirosina hidroxilasa (proteína).* Para realizar este estudio se utilizó un grupo de ratas macho adultas de 250-300 g (n=20) inyectadas estereotáxicamente en las fibras nigroestriatales del haz prosencefálico medial con salino fisiológico con 0.02% de ácido ascórbico, y se dejaron transcurrir 21 días. Todos los animales fueron inyectados con ácido ascórbico en el sistema dopaminérgico del hemisferio izquierdo, mientras que el derecho permanece intacto.

3.2. Estudios *in vitro*:

3.2.1. Grupo experimental B.1: *Efecto de vitamina D a distintas dosis (1 nM-1 µM) y distintos tiempos de tratamiento (12-72 horas) sobre la expresión de GDNF a partir de cultivos primarios neuronales que llevan 11 días de cultivo in vitro (DIV11)* (Ver cultivos primarios en página 35).

3.2.2. Grupo experimental B.2: *Efecto de la neurotoxina 6-OHDA sobre las neuronas de estriado en cultivo y sobre la expresión de ARNm y proteína de GDNF.* Los cultivos primarios (DIV11) se sometieron al efecto de la neurotoxina 6-OHDA a distintas dosis (50 y 100 µM) y distintos tiempos de exposición (2-24 h).

3.2.3. Grupo experimental B.3: *Efecto combinado de vitamina D y la neurotoxina 6-OHDA en el cultivo neuronal, sobre la expresión de ARNm y proteína de GDNF.* Los cultivos

en DIV11 se someten al tratamiento con la vitamina D (10 nM), 48 horas antes de lesionar con la neurotoxina 6-OHDA (50 μ M, durante 2-6-12-24 h).

4. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.

La estereotaxia se practicó en animales previamente anestesiados con 50 mg/kg de Pentobarbital (*Sigma*) inyectada intraperitonealmente, y usando instrumentos estereotáticos con las coordenadas modificadas del atlas Paxinos y Watson (1982) (figuras 13A, B y C).

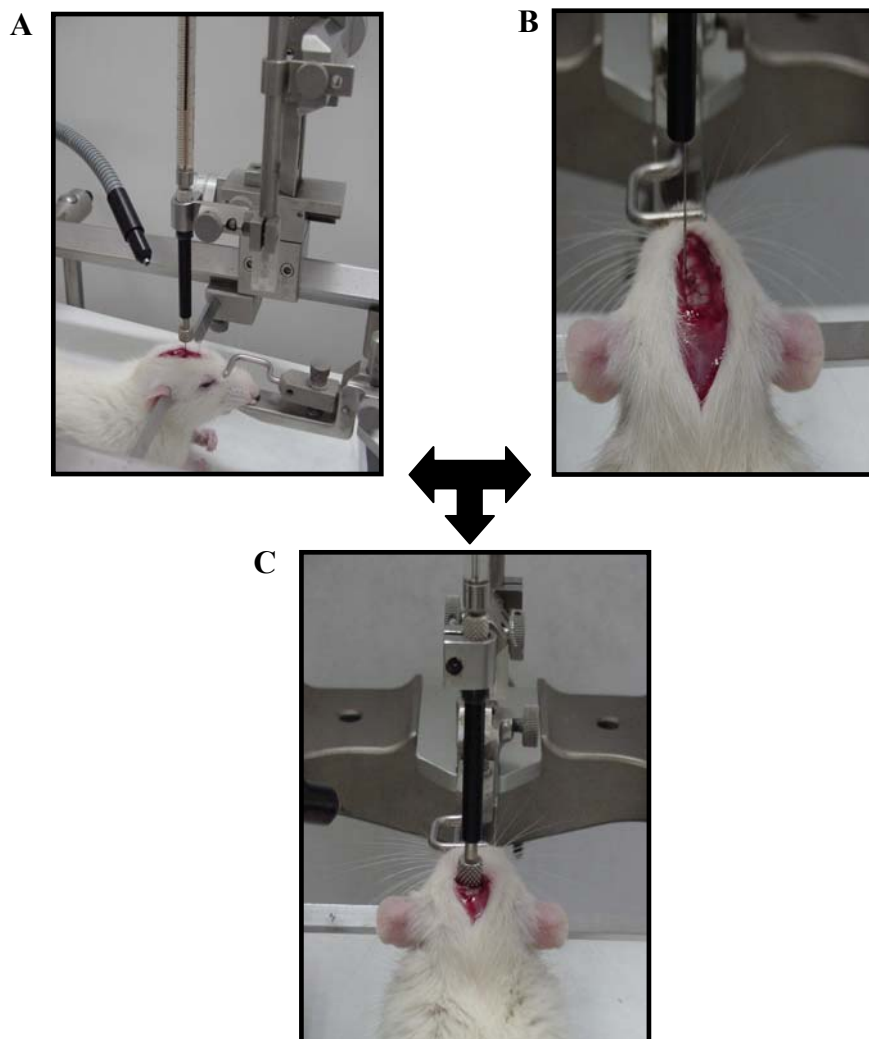


Figura 13. Procedimiento quirúrgico de la inyección estereotóxica de la neurotoxina 6-OHDA en el haz prosencefálico medial donde se localizan las fibras nigroestriatales del hemisferio izquierdo, para obtener animales hemiparkinsonianos. **A**, selección de las coordenadas estereotómicas antes de inyectar 6-OHDA. **B**, momento previo a la inyección de 6-OHDA. **C**, durante la inyección de 6-OHDA.

En los experimentos A.2, A.3 y A.4 de los estudios in vivo, se realizaron lesiones unilaterales específicas en las fibras dopaminérgicas de la vía nigroestriatal del hemisferio izquierdo cerebral que conectan sustancia negra y estriado, mediante la inyección de 8 µg de la neurotoxina catecolaminérgica 6-OHDA disueltos en 2 µl de salino fisiológico con 0.02% de ácido ascórbico, en el haz prosencefálico medial izquierdo (figura 13). Se inyectaron los 2 µl de solución con una jeringa Hamilton a 0.5 µl/minuto, y se esperaron 5 minutos después de la inyección para permitir la difusión de 6-OHDA. El hemisferio derecho del cerebro sirve como control de la lesión inducida en el lado opuesto (figura 14). Tras la cirugía, los animales se devolvieron a sus cajas para que se despertasen y recuperasen.

Las ratas fueron colocadas en un marco de estereotaxia con la barra de incisivos situada 4.5 mm por debajo de la línea interauricular. La inyección de 6-OHDA se realizó en el haz prosencefálico medial utilizando una jeringa Hamilton de 5 µl (*Hamilton 7105 N* [ga 0.6/70 mm/pst 4]; *Hamilton Company, Reno, Nevada, USA*). Las coordenadas de la inyección fueron 4.0 mm anterior a la línea interauricular, 1.2 mm lateral a la línea media y 8.4 mm ventral a la superficie de la corteza, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1982).

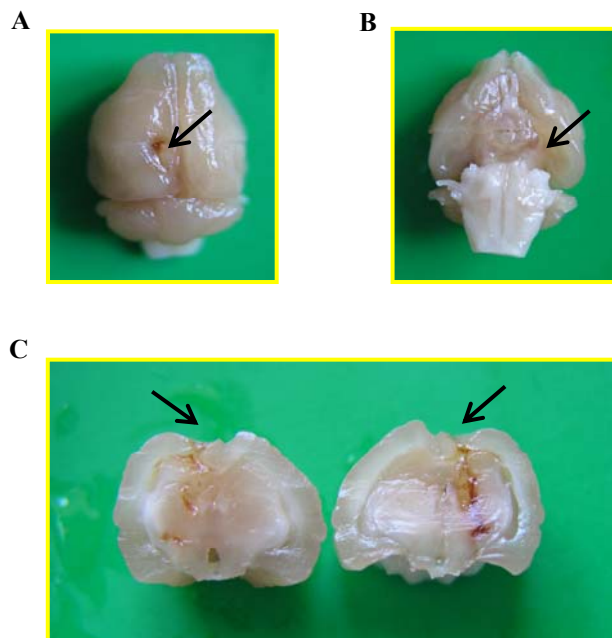


Figura 14. Aspecto del cerebro inyectado con la neurotoxina 6-OHDA. **A**, vista de la parte dorsal del cerebro. **B**, vista de la parte ventral del cerebro. **C**, sección transversal del cerebro. Las flechas indican la zona exacta de la introducción de la aguja.

Para verificar que estas coordenadas son las correctas, se inyectaron 4 µl de una solución proteica de fluoresceína (*Sigma*), la cual permite visualizar la zona exacta en la que

posteriormente se administrará la neurotoxina y valorar si se trata de la localización correcta, así como el grado de difusión de la misma. Para ello los cortes histológicos del cerebro tratado con fluoresceína se visualizan mediante microscopía de fluorescencia (ver figura 23).

5. CULTIVOS PRIMARIOS.

Para hacer el cultivo primario, se decapitan los neonatos, se les extrae el cerebro y a continuación se diseccionan en una placa petri para seleccionar únicamente el caudado y se mantienen en medio de cultivo esencial (Medio Dulbecco mínimo esencial, DMEM; *Sigma*) hasta comenzar la disgregación del tejido.

Los caudados se dispersaron mediante la combinación de un tratamiento enzimático y mecánico. Para ello, los tejidos fueron resuspendidos y triturados en una solución enzimática que contiene 2 mg/ml de Dispasa II (*Boehringer Mannheim Biochemicals*) y 25 µg/ml de DNasa I (*Sigma*) disueltos en DMEM (*Sigma*), previamente filtrada a través de un filtro de 0.2 µm (*Millipore*). La dispersión enzimática se realiza en un incubador a 37 °C bajo una atmósfera de 95% de aire / 5% de CO₂ durante cuarenta minutos. Durante este tiempo, y cada 10 minutos aproximadamente, se realizó también la dispersión mecánica consistente en resuspender las células a través de puntas de menor calibre cada vez.

Al finalizar la disgregación del tejido, las células se lavaron dos veces con DMEM centrifugando 10 minutos a 250 g y 37 °C. Tras la última centrifugación, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en placas de seis pocillos (1.5×10^6 células / pocillo) pretratados con polietilénimina (*Sigma*). Las placas de cultivo utilizadas fueron tratadas previamente a la siembra con el polímero policationico artificial polietilénimina filtrado (1mg/ml, disuelto en tampón borato 0.15 M (pH 8.3)) para permitir la adhesión celular al fondo de la placa. Se incubó 12 horas a 37°C, se hacen 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS; *Sigma*) y finalmente, se añade el medio de cultivo.

El medio de cultivo consiste en medio DMEM complementado con 5% de FBS (*Invitrogen; Scotland, UK*) inactivado por calor (30 minutos a 65°C) (*Invitrogen*), 5% de HS (*Invitrogen*)

inactivado por calor, 2 mM de L-Glutamina (*Invitrogen*), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

A las 24 horas de sembrar las células (neuronales y no neuronales), se añadieron 5 µM de Citosina Arabinonucleósido (Ara-C; *Sigma*) al medio para obtener cultivos libres de células no neuronales, ya que Ara-C suprime la proliferación de las células no neuronales. Cada 3-4 días se cambia el medio de cultivo por medio fresco y se añade de nuevo Ara-C; a partir de los 11 días (DIV11), los cultivos son predominantemente neuronales y pueden ser utilizados en los experimentos que se detallan a continuación (figura 15)

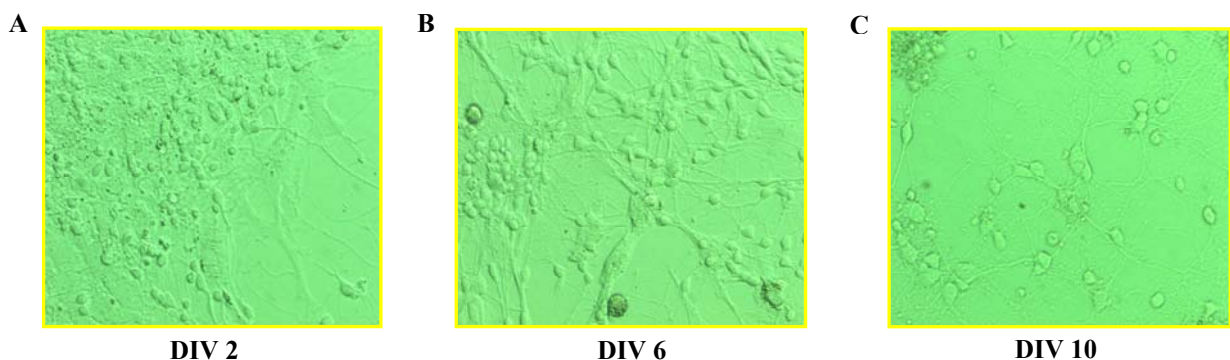


Figura 15. Cultivo primario neuronal distintos días después de haber establecido el cultivo in vitro (DIV). A medida que transcurre el tiempo el cultivo se hace más puro en neuronas y éstas se van diferenciando y estableciendo más contactos sinápticos entre ellas. **A**, células en cultivo a los 2 días (aumento objetivo 10X), **B**, a los 6 días (aumento objetivo 10X) y **C**, a los 10 días (aumento objetivo 40X) después de haber sido sembradas.

6. EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO.

6.1. Extracción de ARN total.

6.1.1. Estudio *In Vivo*.

Tras concluir los tratamientos, los animales se anestesiaron y mataron, para luego extraer el estriado que va a ser conservado a -80 °C hasta su procesamiento.

El estriado extraído de los animales de todos los grupos experimentales se procesa de la misma manera. En primer lugar se homogeniza mecánicamente con un homogenizador

(*Polytron*) en 1 ml de TRIzol (*Invitrogen*). El producto de la homogenización se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y luego se añaden 0.2 ml de cloroformo; las muestras se agitan fuertemente, se incuban 2-3 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugan a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, la mezcla se separa en tres fases, una de ellas, la superior y acuosa, contiene exclusivamente el ARN. Esta fase se recoge, se traslada a un tubo limpio, se le añade 0.5 ml de isopropanol y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C, y se obtiene el ARN total precipitado y visible en el fondo del tubo que se lava con etanol 75%, se vortea y se vuelve a centrifugar a 7.500 g durante 5 minutos a 4 °C. Una vez seco el precipitado, se resuspende en agua destilada tratada con el inhibidor de RNasa, dietilpirocarbonato (DEPC) (*Sigma*) al 0.1%, y se guarda a -80 °C hasta su utilización.

6.1.2. Estudio *In Vitro*.

Para la extracción de ARN a partir de los cultivos primarios se utilizó una modificación del protocolo utilizado en el estudio *in vivo*, que permite aislar ARN a partir de pocas células. Básicamente, la diferencia radica en que tras añadir 800 µl de TRIzol al pocillo y homogenizar las células tras un repetitivo pipeteo, se agregan 250 µg/ml de glicógeno, el cual permanece en la fase acuosa y actúa como arrastrante ya que coprecipita junto al ARN sin interferir en la reacción de RT-PCR.

El precipitado obtenido al final del proceso de extracción se resolubiliza en 30-50 µl de agua con DEPC y se almacena a -80 °C hasta su procesamiento.

6.2. Cuantificación de ARN total.

Para la cuantificación del ARN total se utiliza el espectrofotómetro ajustado a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorción a 260 nm, proporciona la cantidad de ácido nucleico y la absorción a 280 nm, la cantidad de proteína. La pureza del ARN viene dada por el cociente A260/280, siendo aceptable la oscilación 1.8-2.

6.3. RT-PCR.

La reacción de síntesis de ADNc se realiza en un volumen total final de 30 µl, y con los siguientes componentes: 2 µg de ARN total, 6 µl de tampón (5X First Strand Buffer, *Invitrogen*, conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM DTT); 5 mM MgCl₂; 2 mM de cada dNTP (*Invitrogen*); 500 ng de random primers (*Invitrogen*); 20 unidades de inhibidor de RNasa (RNasin; *GeneCraft, Germany*) y 400 unidades de M-MLV-RT (*Invitrogen*). La mezcla se incubó durante 50 minutos a 37 °C, 15 minutos a 45 °C y 5 minutos a 95 °C.

De los 30 µl de ADNc, se toman 5 µl y se amplifican en un volumen total final de 50 µl junto a los siguientes componentes: 5 µl de tampón de PCR (10X PCR Buffer, *GeneCraft* que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM de cada dNTP (*Invitrogen*); 25 pM de cada oligonucleótido y 2 unidades de Taq ADN polimerasa (*GeneCraft*). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia del gen se diseñaron a partir de la secuencia de ARNm del gen a estudiar, como se refleja en el esquema siguiente:

	Oligonucleótido	Secuencia	Producto
GDNF	Sentido	5'CCAATATGCCCCGAAGATTATCC3'	254 pb
	Antisentido	5'TTCGTAGCCCCAAACCCAAG3'	
GAPDH	Sentido	5'TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG3'	239 pb
	Antisentido	5'TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCA3'	

La reacción de PCR ocurre bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 57 °C para GDNF y a 62 °C para GAPDH durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1 minuto, y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. El número de ciclos utilizado es de 35 ciclos para GDNF y 27 ciclos para GAPDH, respectivamente.

Los productos de PCR se visualizan en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X (TAE 50X: 2 M trizma base, 50 mM EDTA, 8 mM ác. acético glacial) teñidos con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta acoplada al sistema de imagen digital GS-670 (Molecular Analyst; *BioRad*) que permite cuantificar la densidad óptica de las bandas.

6.4. Análisis de Restricción.

Para verificar la autenticidad del producto de amplificación obtenido con los oligonucleótidos de GDNF, se hace un corte enzimático con la enzima de restricción *EcoR I* (Amersham Biosciences, Sweden) (figura 16) en un volumen total final de 50 µl en el que se mezclan 33 µl de agua destilada, 20 U de *EcoR I* (Amersham Biosciences), 5 µl de tampón One-Phor-All PLUS 10X (100 mM Tris-acetato, pH 7.5; 100 mM acetato de magnesio y 500 mM de acetato potásico) (Amersham Biosciences) y 10 µl del cDNA obtenido en la PCR. La mezcla de reacción se incuba 1 hora a 37 °C, y a continuación, la enzima se inactiva durante 15 minutos a 60 °C. Finalmente se toman 10 µl y se visualizan los productos obtenidos del corte enzimático con *EcoR I* (102 y 152 pb) en un gel de agarosa al 2%.



Figura 16. Secuencia del ADNc del gen de GDNF de rata de 700 pb (referencia NM-019139) obtenida de PubMed.

7. EXPRESIÓN DE PROTEÍNA.

7.1. Extracción de la proteína.

7.1.1. Estudio *In Vivo*.

Al finalizar los tratamientos, las ratas se anestesiaron y mataron para extraerles el estriado, rápidamente guardado a -80 °C hasta su procesamiento. El estriado se homogeniza mecánicamente en un *polytron* en 1 ml de tampón RIPA (1X PBS, 1% nonidet P-40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS; en el momento de su utilización se añaden los inhibidores de proteasas 10 mg/ml de PMSF, 50 mg/ml de aprotinina y 100 mM de ortovanadato sódico) manteniendo la temperatura la 4 °C, se incuba 30 minutos en hielo y el homogenado se centrifuga a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido contiene las proteínas que serán cuantificadas por el método de Bradford.

7.1.2. Estudio *In Vitro*.

Las placas de cultivo se lavan tres veces con PBS, se despegan del pocillo con 0.2 ml de tampón RIPA y incuban 30 minutos en hielo. Finalmente, los homogenados se centrifugan a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C, de forma que el sobrenadante contiene el las proteínas que serán cuantificadas por el método Bradford.

7.2. Western Blot.

Del extracto proteico total de cada muestra, se toman 75 µg que se resuspende en tampón de carga 1X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2% β-mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol) y se hierven durante 5 minutos. La electroforesis se realiza en geles SDS-PAGE al 12% a 120 V durante 2 horas en el tampón de electroforesis (25 mM trizma base, 192 mM glicina y 0.1% SDS).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol) a 4°C y 0.2 A durante 2 horas; ésta se bloquea con una solución de bloqueo (PBS con 0.2 % I-Block y 0.1% Tween 20) durante

1 hora a temperatura ambiente y en agitación, y finalmente se incuba toda la noche a 4 °C con el primer anticuerpo anti-GDNF policlonal (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo diluída 1:10 en PBS. Tras 5 lavados de 5 minutos con una solución de lavado (PBS con 0.1% Tween 20), la membrana se incuba con el segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo, durante 1 hora y en agitación. Se vuelven a hacer 5 lavados de 5 minutos con solución de lavado, y a continuación se hacen 2 lavados adicionales de 8 minutos con tampón de ensayo. La señal quimioluminiscente se detecta al incubar la membrana con el sustrato CSPD® (*Tropix; PE Biosystem; Bedford, MA, USA*) durante 5 minutos y sin agitación, y al exponerla ante placas autorradiográficas.

Las membranas que se rehibridan con el anticuerpo de α -tubulina utilizado como control interno de carga, se sumergen en la solución de estripado (0.2 M glicina pH 2.2, 0.1% SDS, 1% Tween 20) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente, y se lavan 3 veces durante 8 minutos con solución de lavado, para luego volver a incubar con la solución de bloqueo.

Las placas autorradiográficas permiten visualizar y cuantificar bajo luz visible, la densidad óptica de las bandas correspondientes a la proteína correspondiente. Para ello la fuente de luz se conecta al sistema de imagen digital GS-670 (Molecular Analyst), que permitirá hacer el cálculo numérico.

8. SUPERVIVENCIA CELULAR.

Para cuantificar la supervivencia celular, se realiza un ensayo de proliferación celular colorimétrico basado en la metabolización de la sal MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio; *Roche Biochemicals; Mannheim, Germany*).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ l por pocillo, hasta DIV11, momento en el que se someten a los distintos tratamientos. A continuación, se añaden 10 μ l del reactivo MTT (Solución 1X: 5 mg/ml de MTT en 5 ml PBS) a cada pocillo a una concentración final de 0.5 mg/ml, y se incuba durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, se añaden 100 μ l de solución solubilizadora (10% de SDS en 0.01M de HCl) y se incuba toda la noche en una atmósfera húmeda (37 °C, 5% de CO₂). Los cristales de formazán

solubilizados generan una solución coloreada que se cuantifica espectrofotométricamente utilizando un lector de placas multipocillo (ELISA). La longitud de onda para medir la absorbancia del producto formazán es de 550 nm.

9. ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO.

A los 20 días de ser lesionadas con el neurotóxico 6-OHDA, las ratas fueron sometidas a un estudio de comportamiento en el que se indujo la rotación del animal mediante la administración de Apomorfina (*Sigma*), lo cual permite valorar el efecto neurodegenerativo y lesionante de la neurotoxina.

El ensayo se hizo alrededor de las 17 horas coincidiendo en el período activo de las ratas, dentro de cajas rectangulares en las que se introduce el animal, y consistió en observar y contar, utilizando una videocámara, el número de rotaciones completas (360°) así como su direccionalidad (ipsilateral o contralateralmente a la lesión) antes y después de administrarle 0.5 mg de apomorfina (5 mg/10 ml) inyectada subcutáneamente. El estudio se realiza dentro de los 60 minutos posteriores a la inyección de la apomorfina, lo que permitió comparar el efecto de la misma en los animales lesionados respecto a los animales control. Se cuentan como positivos los giros contralaterales, y negativos, los ipsilaterales respecto a la lesión.

10. INMUNOHISTOQUÍMICA.

10.1. Inmunohistoquímica de los experimentos *in vivo*.

Una vez terminado el período de tratamiento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) y sometidos a la técnica de fijación por perfusión intracardiaca (figura 17) con paraformadehído al 4 °C en tampón fosfato 100 mM, pH 7.4. Para ello, se abre la cavidad torácica y el pericardio con el animal profundamente anestesiado, se realiza una pequeña incisión del ventrículo de izquierdo en la proximidad de la punta del corazón, y se introduce una cánula hasta llegar a la raíz de la aorta para luego administrar 500 ml del fijador, haciendo un

lavado previo con 50 ml de solución salina a 37 °C. La eficacia de la perfusión puede constatarse por la rigidez que adquiere que el animal.

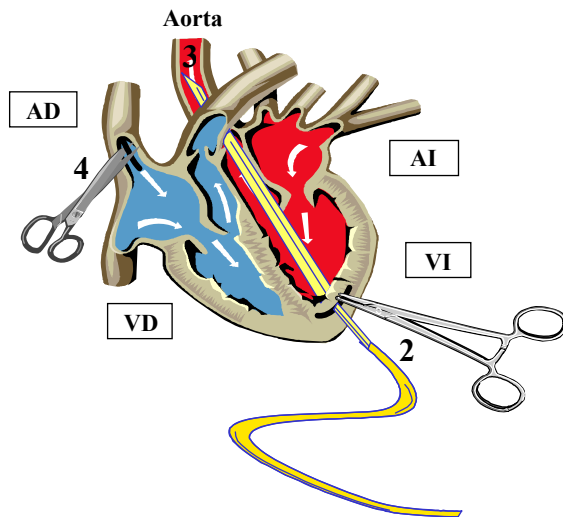


Figura 17. Representación gráfica de la técnica de fijación por perfusión (Morel y col., 2000).

- 1: Apertura de la caja torácica.
- 2: Incisión en el ventrículo izquierdo.
- 3: Inserción de la cánula.
- 4: Apertura de la aurícula derecha.

Finalmente, se extraen los cerebros y se realiza una postfijación de 2-4 horas a 4 °C sumergiéndolos en el mismo fijador. Tras un lavado de 1 hora en tampón fosfato se cortaron en un vibratomo (*Vibratome® Series 1000*) a 50 µm de grosor, y sobre estos cortes se realizó la técnica inmunohistoquímica en flotación.

Para realizar el estudio de la expresión tisular de las proteínas GDNF y tirosina hidroxilasa (TH), se realizó una técnica inmunohistoquímica utilizando los siguientes anticuerpos primarios y diluciones: anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, anti-GDNF (*Santa Cruz Biotechnology, USA*), utilizado a una dilución 1:500, y el anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón anti-TH (*Sigma*), utilizado a una dilución 1:1000. En ambos casos, la dilución de anticuerpo primario se preparó con un diluyente de anticuerpo comercial (*Dakopatts, Glostrup Denmark*), y se incubaron los cortes toda la noche a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, los cortes se lavan 2 veces durante 10 minutos con PBS (tampón fosfato salino 100 mM, NaCl 300 mM, pH 7.4), y se bloquea la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (*Merck*) al 3% diluido en agua destilada durante 10 minutos.

A continuación, y tras hacer un par de lavados con PBS durante 10 minutos, los cortes se incuban con un polímero de dextrano conjugado con la enzima peroxidasa y la Ig anti-ratón (en

el caso de TH) o anti-conejo (en el caso de GDNF) (*EnVision® peroxidasa; Dakopatts*) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se vuelven a lavar con PBS durante 10 minutos, y finalmente la reacción se revela con 3,3'-Diaminobencidina Tetrahidrocloreuro (DAB) (*Dakopatts*). Tras un lavado con PBS y agua destilada, se procede a la recogida de las secciones en portaobjetos silanizados (*Histobond adhesión Micro Slides; Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany*). Los cortes se dejan secar toda una noche a temperatura ambiente, se deshidratan en etanol, se aclaran en xilol y finalmente se montaron con un medio permanente DPX (*BDH; Gurr, UK*).

Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas con un microscopio de observación en campo claro Olympus Provis AX70 (*Olympus Corp.; Tokyo, Japan*).

10.2. Inmunohistoquímica de cultivos primarios neuronales.

Para comprobar la pureza de los cultivos primarios neuronales, se utilizaron distintos marcadores que indican la presencia de otras poblaciones celulares en el cultivo.

La suspensión celular ($7.5 \cdot 10^5$ células/pocillo) se siembra sobre cubreobjetos pretratados con PET en placas de 24 pocillos con el medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y HS inactivados, penicilina y glutamina, y se sigue el protocolo ya descrito. A los 11 días (DIV 11), los cultivos de estriado se fijan con metanol frío, lavando previamente con formol-PBS al 4% durante 10 minutos y PBS durante 5 minutos. A continuación, y antes de incubar con el anticuerpo primario, los cubreobjetos se someten a un pretratamiento que consiste en la incubación con tampón citrato sódico 10 mM pH6 en el microondas a 750 vatios durante 20 minutos; se deja enfriar 20 minutos y se lava dos veces con PBS a temperatura ambiente.

Para realizar este estudio se utilizaron anticuerpos primarios para los marcadores proteicos de la población celular glial y microglial, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y la proteína de membrana CD68, respectivamente. El anticuerpo monoclonal anti-GFAP (*Dako*) se utiliza a una dilución 1:400, mientras que el anticuerpo monoclonal anti-CD68 (*Dako*) se emplea a una dilución de trabajo 1:100; ambos se incuban toda la noche a 4 °C. Finalizado el período de incubación, los cubreobjetos se lavan 2 veces con PBS durante 10 minutos y se procede a la inmunodetección mediante el método de polímeros de dextrano descrito anteriormente.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada experimento fue realizado al menos tres veces. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Las medias fueron comparadas utilizando el *U-test Mann-Whitney*, *t-test* y/o el *Test de las Comparaciones Múltiples Tukey-Kramer*. Los datos significativos se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.009$, 0.004, 0.002 y 0.001, y **** $p < 0.0001$ dependiendo del nivel de significación de cada caso.

5. RESULTADOS

1. ESTUDIO *IN VIVO*.

1.1. Efecto de la administración intraperitoneal de Vitamina D sobre la expresión de GDNF en ratas macho adultas.

1.1.1. Expresión de ARNm de GDNF.

El factor neurotrófico GDNF se expresa en multitud de tejidos, incluidas muchas regiones del sistema nervioso (Choi-Lundberg y Bohn, 1995). El estriado (caudado) es uno de los principales núcleos sintetizadores del factor neurotrófico. Sin embargo, se desconoce si la vitamina D ejerce algún papel modulador sobre la expresión de este factor neurotrófico en esta región. De este modo, en primer lugar se estudiaron los niveles de expresión del ARNm de GDNF mediante RT-PCR en el estriado, tras someter a los animales a un tratamiento intraperitoneal (i.p.) con vitamina D durante 7 días consecutivos (figura 18). El producto amplificado mediante PCR para GDNF es de 254 pb, mientras que el producto obtenido para el control de carga interno GAPDH, es de 239 pb.

Ambos productos se visualizan en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, y se verifica su autenticidad mediante una digestión enzimática; para ello, el producto obtenido de la PCR de GDNF, de 254 pb, se somete a la digestión con la enzima de restricción *EcoR I*, liberándose dos fragmentos de 102 y 152 pb (figura 19).

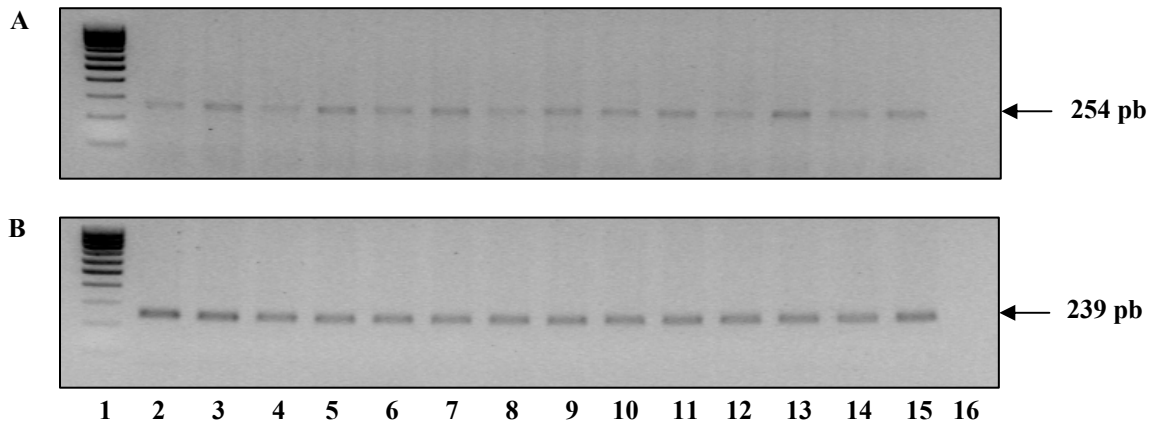


Figura 18. Efecto del tratamiento de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado). **(A)** Productos de PCR obtenidos para GDNF a partir del caudado (estriado) de ratas tratadas intraperitonealmente (i.p.) con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y salino. Calle 1: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 pb; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GDNF en animales tratados i.p. con salino; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GDNF en animales tratados i.p. con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; calle 16: control negativo de PCR. **(B)** Productos de PCR obtenidos para GAPDH a partir del caudado (estriado) de ratas tratadas i.p. con salino y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GAPDH en animales tratados i.p. con salino; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GAPDH en animales tratados i.p. con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; calle 16: control negativo de la PCR.

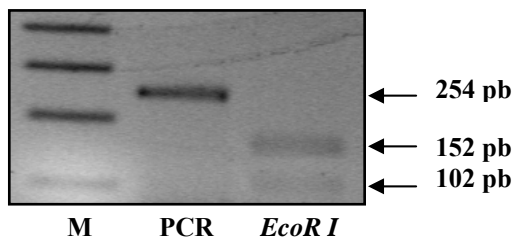


Figura 19. Análisis de restricción con la enzima *EcoRI*. M: marcador de pesos moleculares. Calle 2: producto de la RT-PCR de GDNF. Calle 3: digestión enzimática del producto de PCR con la enzima *EcoRI* que genera dos fragmentos de 102 y 152 pb.

Los valores obtenidos a partir de la densitometría de los productos de PCR (figura 20) indican que la vitamina D induce un incremento significativo ($P < 0.01$) de la expresión del ARNm de GDNF en el grupo de ratas tratadas durante 7 días con vitamina D i.p., respecto al grupo control (Control: 0.60 ± 0.02 ; VIT D: 0.74 ± 0.07).

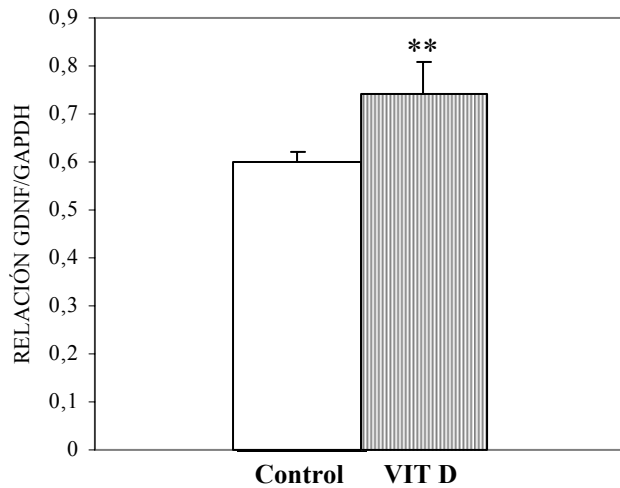


Figura 20. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de GDNF amplificado por RT-PCR en el estriado (caudado) del grupo de ratas tratadas i.p. con vitamina D, respecto a las ratas control. ** $p < 0.01$

1.1.2. Expresión proteica de GDNF.

Para estudiar la síntesis de proteína de GDNF inducida por la administración i.p. de vitamina D en un grupo ratas, respecto a otro grupo control, se utilizó la técnica de Western blot, la cual permitió detectar dos isoformas de aproximadamente 38 y 34 kD, correspondientes a la forma glucosilada (la más pesada) y no glucosilada (la más ligera) (figura 21).

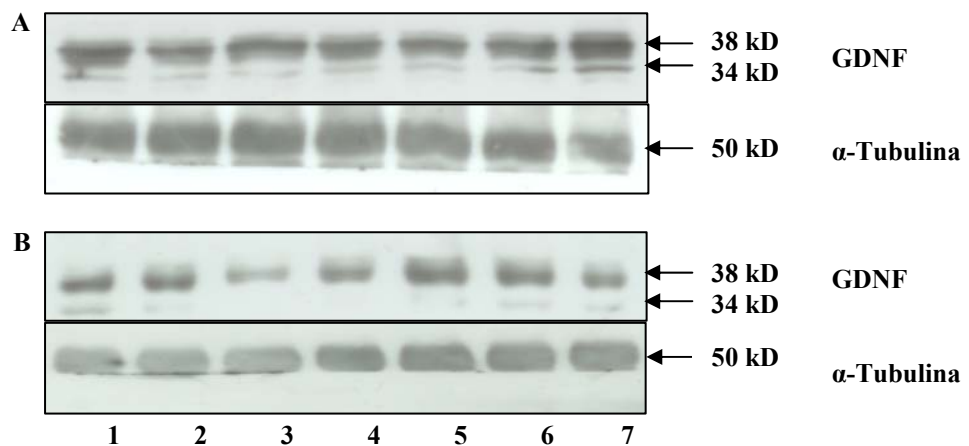


Figura 21. Efecto del tratamiento de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la expresión de proteica de GDNF en el caudado (estriado). **(A)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) de ratas tratadas i.p. con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. **(B)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) de ratas tratadas i.p. con salino. Las bandas inmunorreactivas de 34 y 38 kD para GDNF y 50 kD para α -tubulina se indican mediante flechas.

Los valores obtenidos por la densitometría de las bandas (figura 22) muestran un incremento significativo ($P<0.01$) de la síntesis proteica de GDNF en el grupo de ratas tratadas i.p. con vitamina D durante 7 días consecutivos, respecto al grupo control (Control: 0.55 ± 0.1 ; VIT D: 0.75 ± 0.1).

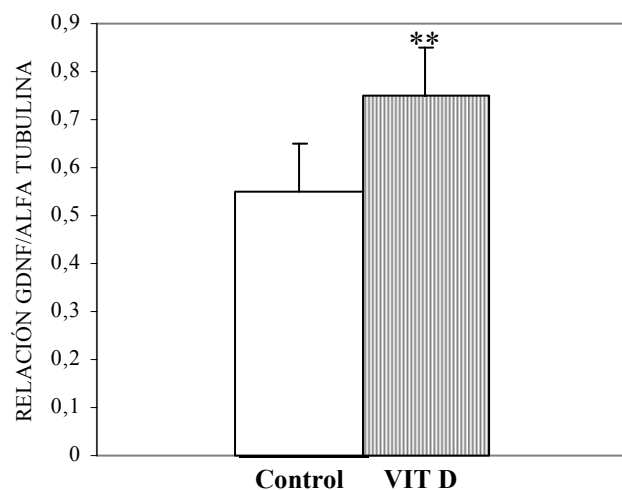


Figura 22. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la síntesis proteica de GDNF a partir del Western blot en el estriado (caudado) del grupo de ratas tratadas con vitamina D i.p., respecto al grupo control. ** $p<0.01$

1.2. Modelo Hemiparkinsoniano animal inducido por 6-Hidroxidopamina (6-OHDA).

Además de estudiar el efecto de la administración de 6-OHDA sobre la neurodegeneración de la población de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y el estriado, y sobre la expresión del factor neurotrófico GDNF (a nivel de ARNm y proteína) en el estriado, también se valoró el efecto de la Vitamina D antes (efecto pre-lesión) y después de lesionar (efecto post-lesión), sobre la degeneración neuronal y sobre la expresión de GDNF en la sustancia negra y estriado. Se estableció también un grupo adicional de ratas con lesión simulada a las que se les administró estereotáxicamente ácido ascórbico diluido en salino fisiológico, para comprobar si la propia técnica quirúrgica puede modular la expresión del factor neurotrófico, interfiriendo así en los resultados.

Se tendrá en cuenta de aquí en adelante que el modelo animal parkinsoniano utilizado es unilateral, ya que se lesiona únicamente la vía nigroestriatal izquierda, mientras que el lado derecho permanece inalterado. De este modo, cada animal lesionado unilateralmente sirve de control de sí mismo a través del lado contralateral a la lesión.

1.2.1. Inyección de la solución de Fluoresceína.

La visualización de la zona inyectada mediante la emisión de fluorescencia (figura 23) a partir de las secciones de cerebro, permite confirmar que las coordenadas estereotáxicas utilizadas son las correctas para comenzar a lesionar con la neurotoxina y que la solución inyectada no difunde a los tejidos adyacentes.

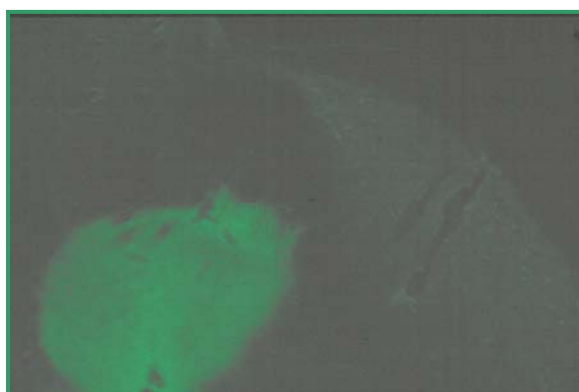


Figura 23. Inyección de Fluoresceína (4X).

1.2.2. Efecto de la inyección estereotóxica de 6-OHDA en las fibras nigroestriatales.

En primer lugar se estudió el efecto de la administración de 6-OHDA inyectada en las fibras nigroestriatales, sobre la expresión de ARNm y de la proteína de GDNF, así como sobre la expresión de TH tanto en el estriado como en la sustancia negra, estructuras que permanecen conectadas entre sí a través de la vía nigroestriatal en la que se inyecta la neurotoxina.

1.2.2.1. Expresión de ARNm de GDNF.

A partir del ARN extraído del caudado de 8 ratas lesionadas con 6-OHDA durante 21 días, se realiza una RT-PCR (figura 24) que amplifica un fragmento de 254 pb y que se visualiza en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Como control interno de carga se utiliza el producto de PCR de GAPDH, de 239 pb.

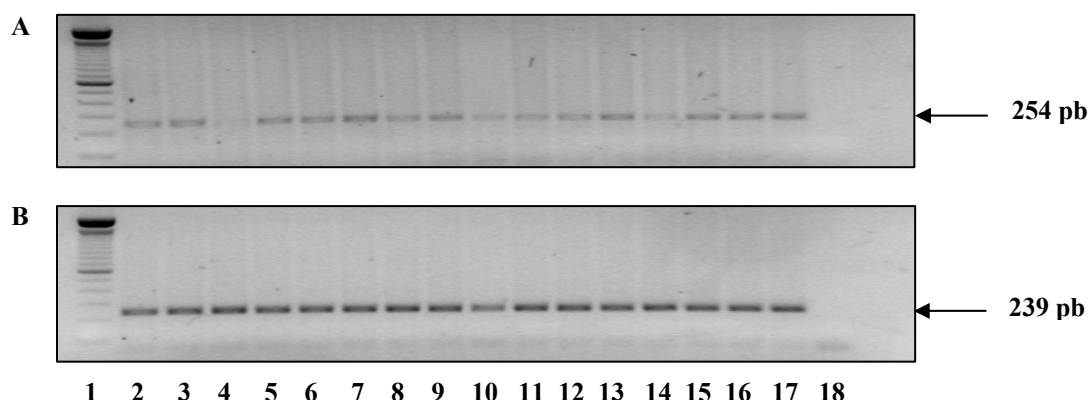


Figura 24. Efecto de la inyección unilateral estereotóxica de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial sobre la expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. **(A)** Productos de PCR obtenidos para GDNF a partir del caudado (estriado) del hemisferio lesionado con 6-OHDA. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión; calle 16: control negativo de PCR. **(B)** Productos de PCR obtenidos para GAPDH a partir del caudado (estriado) del hemisferio lesionado con 6-OHDA. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión; calle 16: control negativo de la PCR.

El análisis densitométrico de los productos obtenidos a partir de la RT-PCR (figura 25) indica que la lesión inducida por la 6-OHDA en la vía nigroestriatal, no incrementa de forma significativa los niveles de expresión de ARNm de GDNF en el estriado del lado izquierdo lesionado (0.80 ± 0.04) cuando se compara con el lado derecho control (0.73 ± 0.07).

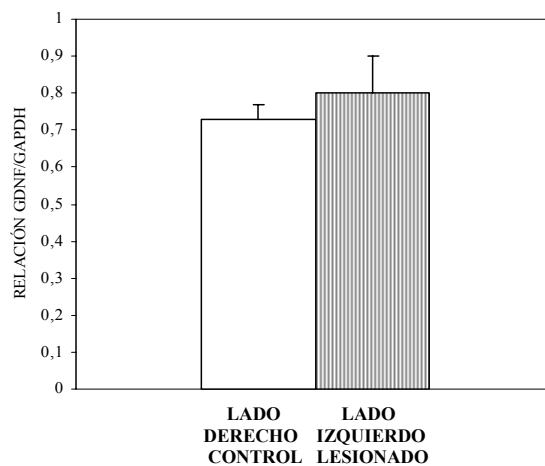


Figura 25. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de GDNF amplificado por RT-PCR en el estriado (caudado) del hemisferio ipsilateral a la lesión, respecto al hemisferio contralateral no lesionado con 6-OHDA.

1.2.2.2. Expresión proteica de GDNF.

La expresión proteica de GDNF se detectó a partir de extractos de caudado obtenidos a partir de otro grupo de 8 ratas lesionadas con la 6-OHDA durante 21 días, mediante Western blot (figura 26). Como control de carga interno se utilizó la proteína α -tubulina. De este modo se detectaron dos bandas de la proteína GDNF correspondientes a la forma glicosilada (38kD) y deglicosilada (34kD) del factor neurotrófico, y una sola banda correspondiente a la proteína de 50 kD de la α -tubulina.

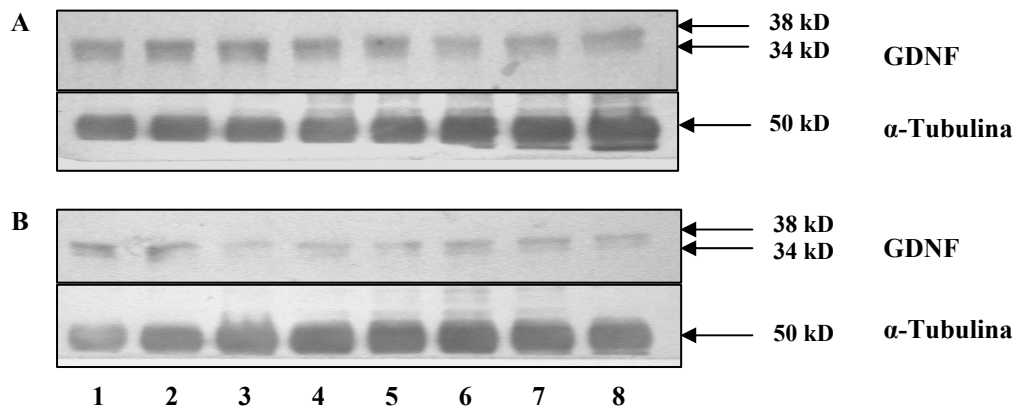


Figura 26. Efecto de la inyección unilateral estereotáxica de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial sobre la expresión proteica de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. **(A)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión. **(B)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión. Las bandas inmunorreactivas de 34 y 38 kD para GDNF y 50 kD para α -tubulina se indican mediante flechas.

Los resultados densitométricos indican que la lesión inducida por la 6-OHDA incrementa de forma significativa ($P < 0.004$) los niveles de GDNF en el estriado del lado izquierdo lesionado (0.60 ± 0.12) respecto al lado derecho control (0.36 ± 0.15) (figura 27).

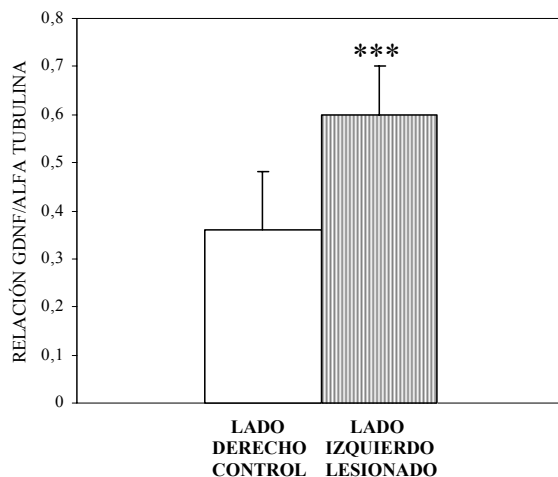


Figura 27. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la síntesis proteica de GDNF obtenida mediante Western blot en el estriado (caudado) del hemisferio ipsilateral a la lesión, respecto al hemisferio contralateral no lesionado con 6-OHDA. *** $p < 0.004$

Además de analizar la expresión de GDNF mediante Western blot, también se analiza mediante inmunohistoquímica en el propio tejido nigral (figura 28A, B y C) y del caudado (figura 29A, B y C). Esta técnica confirma el resultado obtenido mediante Western blot e

indica de una forma más gráfica el incremento de la expresión del factor neurotrófico GDNF en el mismo lado en el que se inyecta unilateralmente la neurotoxina 6-OHDA. Por tanto la lesión actúa estimulando la expresión del factor neurotrófico por parte de las células que integran el sistema nigroestriatal.

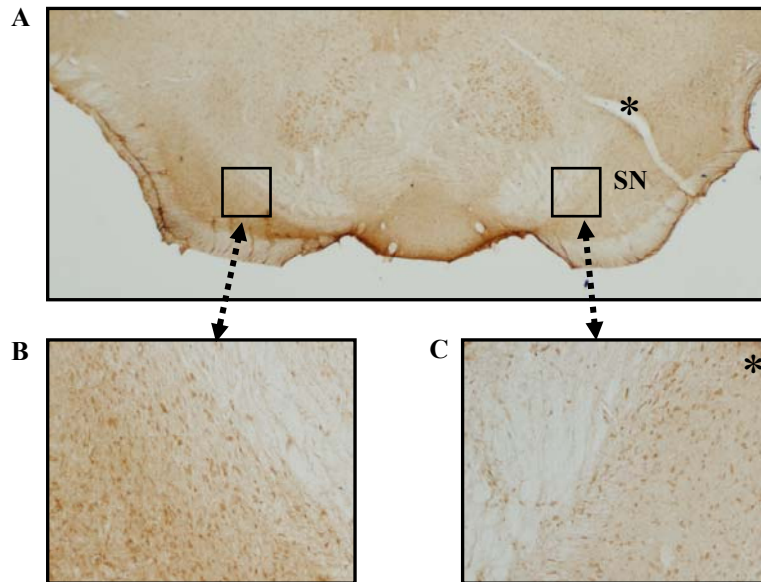


Figura 28. Inmunohistoquímica de GDNF en la sustancia negra (SN) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión con 6-OHDA. **A**, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, SN a mayor aumento de objetivo (10X), en el lado lesionado y no lesionado, respectivamente. El asterisco indica el lado no lesionado.

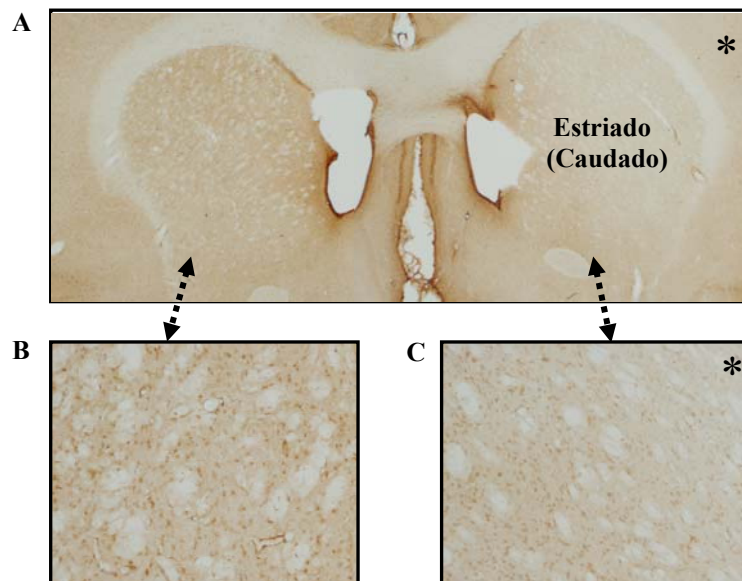


Figura 29. Inmunohistoquímica de GDNF en el estriado (caudado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión con la 6-OHDA. **A**, caudado a menor aumento (1.25X). **B** y **C**, caudado a mayor aumento de objetivo (10X), en el lado lesionado y no lesionado, respectivamente. El asterisco indica el lado no lesionado.

1.2.2.3. Expresión proteica de tirosina hidroxilasa (TH).

La detección proteica de tirosina hidroxilasa se realizó mediante inmunohistoquímica, la cual permitió distinguir el grado de degeneración de la población neuronal dopaminérgica tanto en la sustancia negra (donde están los somas neuronales) (figura 30A, B y C) como en el caudado (a donde llegan los terminales axonales dopaminérgicos) (figura 31) en el lado ipsilateral a la lesión.

El número de cuerpos celulares inmunorreactivos para TH disminuyó claramente en la parte compacta de la sustancia negra ipsilateral (figura 30B) a la inyección en comparación al lado contralateral (figura 30C). Los cuerpos celulares y las dendritas TH positivos, también disminuyeron en la parte reticular de la sustancia negra.

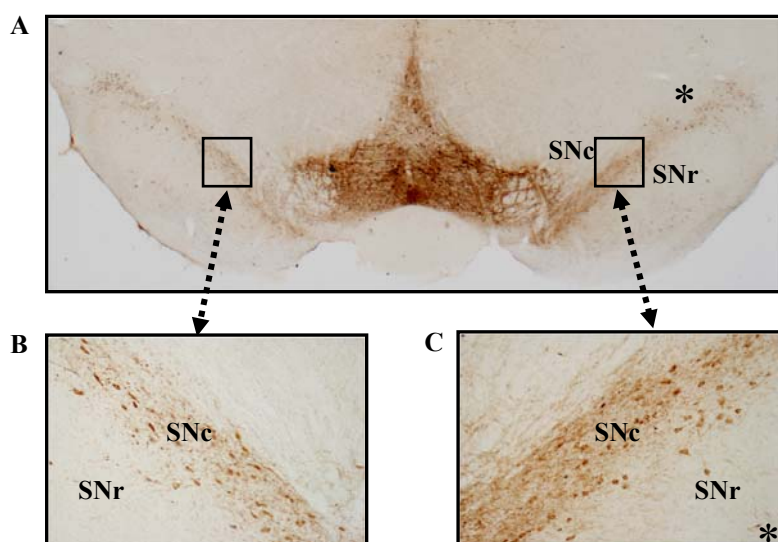


Figura 30. Inmunohistoquímica para TH en la sustancia negra (SN) del grupo de ratas lesionadas con la neurotoxina 6-OHDA. **A**, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, SN a mayor aumento de objetivo (10X) en el lado ipsilateral y contralateral a la lesión con 6-OHDA, respectivamente. El asterisco indica el lado no lesionado.

Además de disminuir la inmunorreactividad de TH en la sustancia negra, que es donde se localizan los somas de las neuronas dopaminérgicas (figura 30A y B), en el lado ipsilateral a la lesión también disminuye la inmunorreactividad para TH en las terminales axonales que llegan al estriado (figura 31).



Figura 31. Inmunohistoquímica para TH en el estriado (caudado) del grupo de ratas lesionadas con la neurotoxina 6-OHDA. Aumento de objetivo 1.25 X. El asterisco indica el lado no lesionado.

1.2.2.4. Estudio de comportamiento.

Tras lesionar las ratas durante 21 días con la neurotoxina 6-OHDA, se evalúa el efecto de la misma sobre el comportamiento motor de la rata. Lo primero que se aprecia a simple vista es la lentitud y torpeza de movimientos de la rata, así como la dificultad para articular el paso, de tal manera que son las extremidades posteriores las que se ven más afectadas.

Además del examen visual de la rata lesionada, también se estudia su comportamiento tras administrarle apomorfina subcutáneamente. Prácticamente al instante, las ratas comienzan a rotar hacia el lado contralateral a la lesión, es decir, hacia el lado derecho, y este comportamiento se agudiza a medida que transcurre el tiempo. Se contaron el número de vueltas a lo largo de 1 hora, y se consideraron positivas aquellas contralaterales a la lesión, y negativas, las ipsilaterales a la lesión. De este modo, el número de vueltas positivas fue de 60, al que se le restaron unas 10 vueltas ipsilaterales, por lo que el número de vueltas neto fue de 50. La apomorfina también se administró a animales control no lesionados, de tal forma que no presentaron este comportamiento rotacional.

Este estudio comportamental realizado en animales lesionados y control, fue registrado con viodeocámara.

1.2.3. Efecto de la administración i.p. de Vitamina D antes de lesionar estereotáxicamente las fibras nigroestriatales con 6-OHDA (EFECTO PRE-LESIÓN).

Un segundo grupo de ratas fue sometido a tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (vitamina D i.p., $1\mu\text{g/kg}$ de peso) durante 7 días consecutivos, y a continuación fue lesionado con 6-OHDA hasta completar los 21 días. De este modo se evalúa el efecto preventivo de vitamina D con respecto a la degeneración inducida por la neurotoxina, así como su efecto sobre la expresión de ARNm y proteína de GDNF.

1.2.3.1. Expresión de ARNm de GDNF.

A partir del ARN extraído del caudado del hemisferio ipsilateral y contralateral (control) a la lesión inducida por 6-OHDA de 8 ratas, se realiza una RT-PCR (figura 32) que permitirá cuantificar los niveles de expresión del ARNm de GDNF, utilizando al GAPDH como control interno de carga.

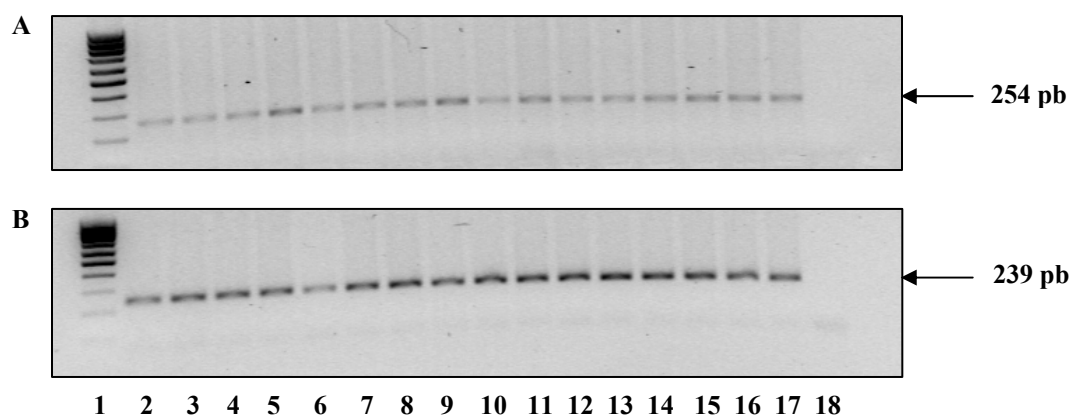


Figura 32. Efecto de la administración i.p. de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antes de lesionar mediante la inyección unilateral estereotóxica de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial, sobre la expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. **(A)** Productos de PCR obtenidos para GDNF a partir del caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión; calle 16: control negativo de PCR. **(B)** Productos de PCR obtenidos para GAPDH a partir del caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión; calle 16: control negativo de la PCR.

Tras analizar densitométricamente la intensidad de las bandas para GDNF, corrigiendo estos valores con los de GAPDH, no se detectan diferencias significativas en los niveles de expresión de ARNm de GDNF en el lado lesionado con 6-OHDA (0.76 ± 0.08) respecto al lado contralateral no lesionado y considerado control (0.75 ± 0.10), en el grupo de ratas pretratadas i.p. con vitamina D antes de inducir la lesión (figura 33).

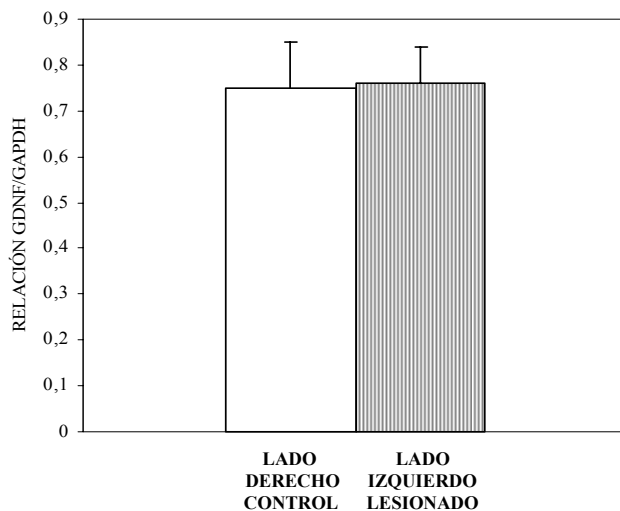


Figura 33. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de GDNF amplificado por RT-PCR en el estriado (caudado) del grupo de ratas pretratadas i.p. con vitamina D y posteriormente lesionadas con 6-OHDA.

1.2.3.2. Expresión proteica de GDNF.

La expresión de GDNF en este grupo de 8 ratas pretratadas i.p. con vitamina D y posteriormente lesionadas con 6-OHDA, también se detecta mediante las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica. El Western blot detecta las dos formas de GDNF ya mencionadas previamente (34 y 38 kD) (figura 34) y permite su cuantificación densitométrica.

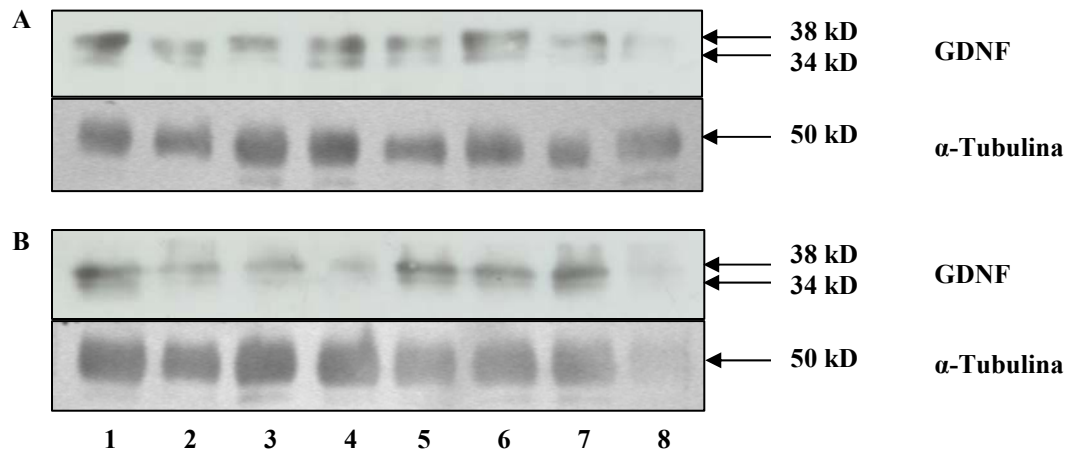


Figura 34. Efecto de la administración i.p. de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antes de lesionar mediante la inyección unilateral estereotáxica de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial, sobre la expresión proteica de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. **(A)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión. **(B)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión. Las bandas inmunorreactivas de 34 y 38 kD para GDNF y 50 kD para α -tubulina se indican mediante flechas.

En este grupo de ratas pretratadas i.p. con vitamina D antes de lesionar, la densitometría de las bandas de GDNF indica que en el lado lesionado del estriado se incrementa de forma significativa ($P < 0.001$) la expresión de GDNF (0.77 ± 0.10) con respecto al lado contralateral no lesionado (0.53 ± 0.19) (figura 35).

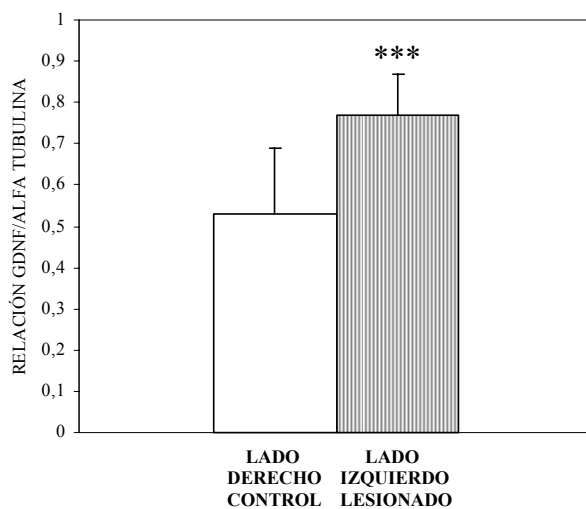


Figura 35. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la síntesis proteica de GDNF detectada mediante Western blot en el estriado (caudado) del grupo de ratas pretratadas i.p. con vitamina D y posteriormente lesionadas con 6-OHDA. *** $p < 0.001$

Por otra parte, el estudio inmunohistoquímico también permite valorar en secciones histológicas de la sustancia negra (figura 36A, B y C) y estriado (figura 37A, B y C), la expresión diferencial de GDNF en el lado ipsilateral y contralateral a la lesión generada por la neurotoxina 6-OHDA. Como se aprecia en la figura 33B, la inmunorreactividad para GDNF en la sustancia negra del hemisferio izquierdo lesionado es mayor respecto al hemisferio derecho.

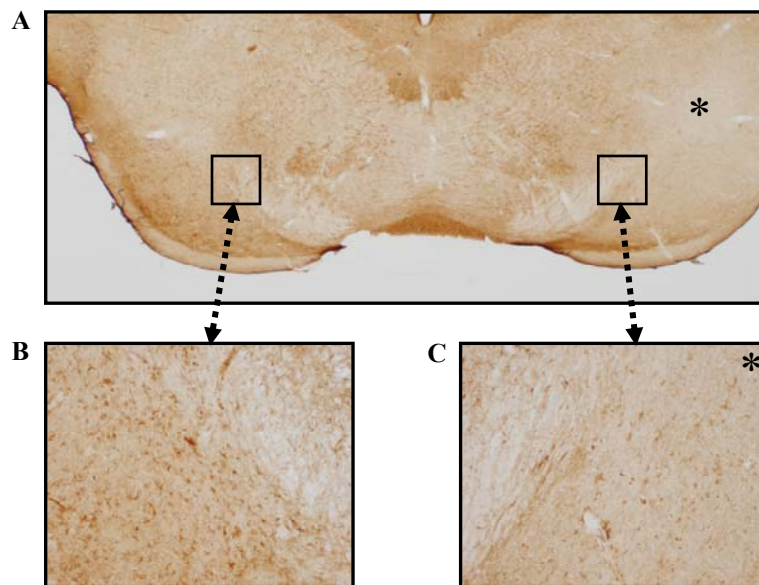


Figura 36. Inmunohistoquímica de GDNF en la sustancia negra (SN) del grupo de ratas pretratadas i.p. con la vitamina D y posteriormente lesionadas con 6-OHDA. **A**, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, SN a mayor aumento de objetivo (10X), en el hemisferio lesionado y no lesionado, respectivamente. El asterisco indica el lado no lesionado.

Por otra parte, en el estriado (caudado) del lado ipsilateral a la lesión también se incrementa la inmunorreactividad para GDNF, respecto al lado contralateral como se aprecia en las figura 37B y C, respectivamente.

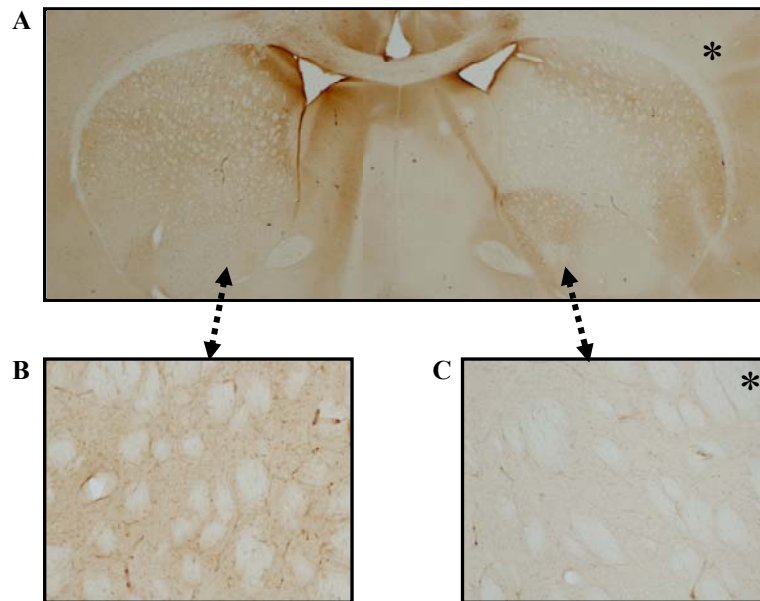


Figura 37. Inmunohistoquímica de GDNF en el estriado (caudado) del grupo de ratas pretratadas i.p. con vitamina D y posteriormente lesionadas con la 6-OHDA. **A**, caudado a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, caudado a mayor aumento de objetivo (10X), en el hemisferio lesionado y no lesionado, respectivamente. El asterisco indica el lado no lesionado.

1.2.3.3. Expresión proteica de TH.

La inmunopositividad para TH es menor en lado izquierdo de la sustancia negra (figura 38A y B) tras lesionar la vía nigroestriatal con la 6-OHDA, mientras que se mantiene en lado derecho no lesionado (figura 38A y C), lo cual indica el efecto neurodegenerativo de la neurotoxina sobre la población dopaminérgica; las células supervivientes de la sustancia negra del lado ipsilateral a la lesión también presentan alterada su morfología celular.

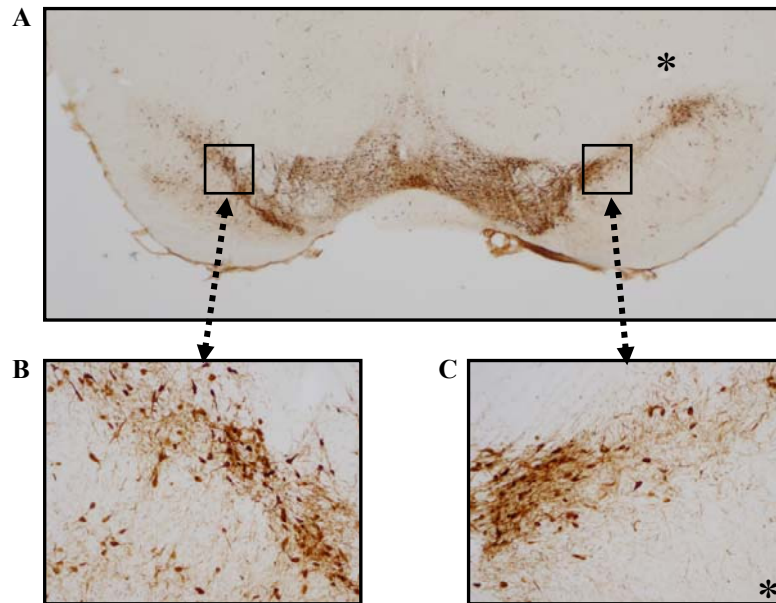


Figura 38. Inmunohistoquímica para TH en la sustancia negra (SN) del grupo de ratas pretratadas i.p. con vitamina D y posteriormente lesionadas con 6-OHDA. A, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). B y C, SN a mayor aumento de objetivo (10X) en el hemisferio ipsilateral (B) y contralateral (C) a la lesión con 6-OHDA. El asterisco indica el lado no lesionado.

De igual modo, la inmunohistoquímica para TH en los terminales axonales de las neuronas dopaminérgicas que llegan al caudado, detecta una menor expresión en el lado izquierdo donde se inyectó la neurotoxina 6-OHDA, mientras que en el lado derecho ésta se mantiene (figura 39).



Figura 39. Inmunohistoquímica para TH en el estriado (caudado) del grupo de ratas pretratadas i.p. con vitamina D y posteriormente lesionadas con la neurotoxina 6-OHDA. Aumento de objetivo 1.25 X. El asterisco indica el lado no lesionado.

1.2.4. Efecto de la administración i.p. de Vitamina D después de lesionar estereotáxicamente las fibras nigroestriales con 6-OHDA (EFECTO POST-LESIÓN).

A los 21 días de haber inyectado la neurotoxina en las ratas, a un tercer grupo de ratas se les administró i.p. 1,25(OH)₂D₃ (vitamina D) durante 1 semana. Finalizado el tratamiento, los animales se decapitan y se cuantifican los niveles de expresión de ARNm y de la proteína de GDNF a partir del caudado, así como el posible efecto curativo de la vitamina D sobre la degeneración dopaminérgica nigroestriatal, tras generar la lesión.

1.2.4.1. Expresión de ARNm de GDNF.

Los niveles de expresión de ARNm de GDNF en el estriado (caudado) en un grupo de 8 ratas, se cuantifican mediante la densitometría de las bandas del producto de PCR de 254 pb obtenidas mediante RT-PCR (figura 40).

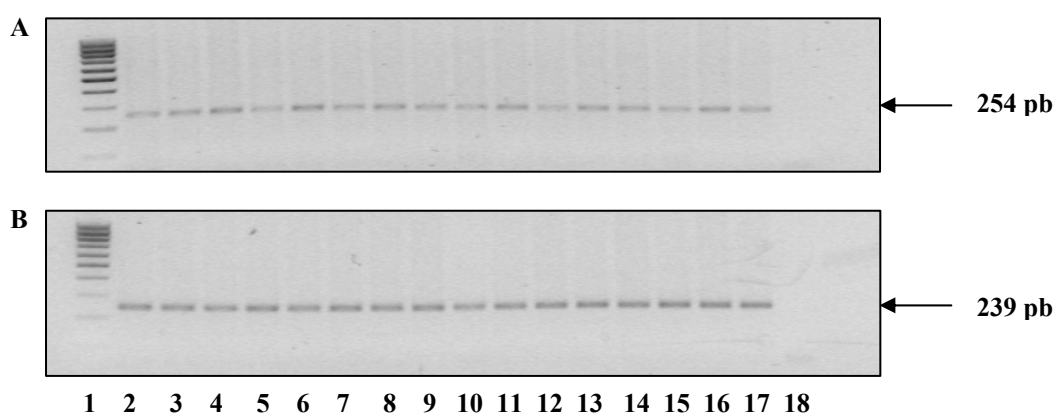


Figura 40. Efecto de la administración i.p. de 1,25(OH)₂D₃ tras lesionar mediante la inyección unilateral estereotáctica de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial, sobre la expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. **(A)** Productos de PCR obtenidos para GDNF a partir del caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión; calle 16: control negativo de PCR. **(B)** Productos de PCR obtenidos para GAPDH a partir del caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión; calles 3,5,7,9,11,12 y 15: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión; calle 16: control negativo de la PCR.

La cuantificación densitométrica del ARNm de GDNF indica que no hay diferencias de expresión significativas entre ambos lados (lesionado y no lesionado) del caudado en este grupo de estudio (figura 41).

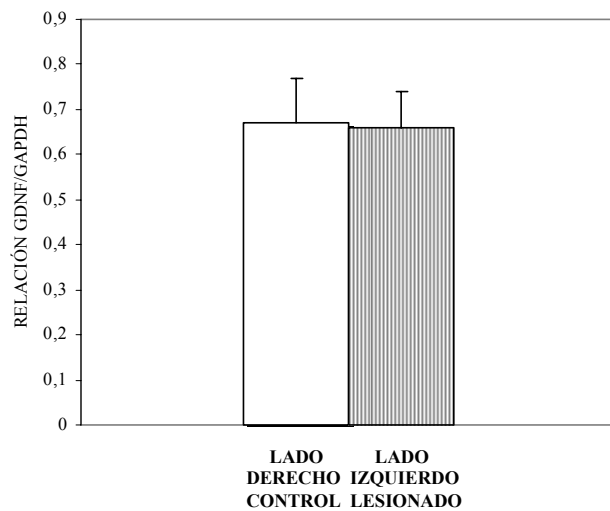


Figura 41. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de GDNF amplificado por RT-PCR en el estriado (caudado) del grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA y posteriormente tratadas i.p. con vitamina D.

1.2.4.2. Expresión proteica de GDNF.

La expresión proteica de GDNF se detecta mediante las técnicas de Western blot (figura 42), en un grupo de 7 ratas, e inmunohistoquímica (figuras 44 y 45), en un grupo de 4 animales. Los resultados indican un incremento de la concentración de la proteína GDNF en el caudado del lado lesionado y posteriormente y tratado con vitamina D, respecto al lado control no lesionado.

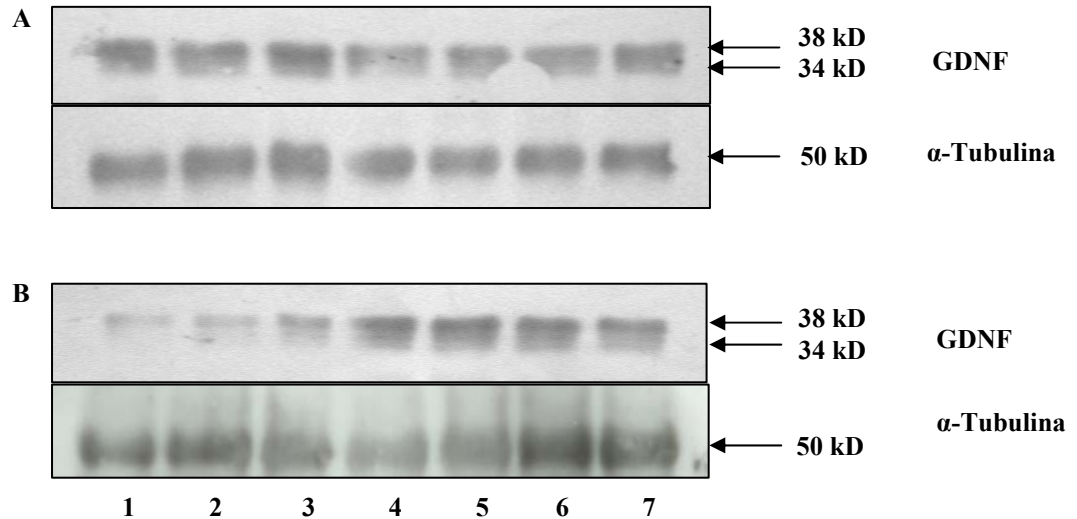


Figura 42. Efecto de la administración i.p. de 1,25(OH)₂D₃ tras lesionar mediante la inyección unilateral estereotáxica de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial, sobre la expresión proteica de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. **(A)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión. **(B)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión. Las bandas inmunorreactivas de 34 y 38 kD para GDNF y 50 kD para α -tubulina se indican mediante flechas.

Los valores obtenidos de la densitometría de las bandas de 38 y 34 kD obtenidas mediante Western blot, indican que la diferencia de expresión del factor neurotrófico GDNF entre el lado ipsilateral (0.88 ± 0.08) y contralateral (0.62 ± 0.10) a la lesión con 6-OHDA y posteriormente tratado con vitamina D i.p., es significativa ($P < 0.009$) (figura 43).

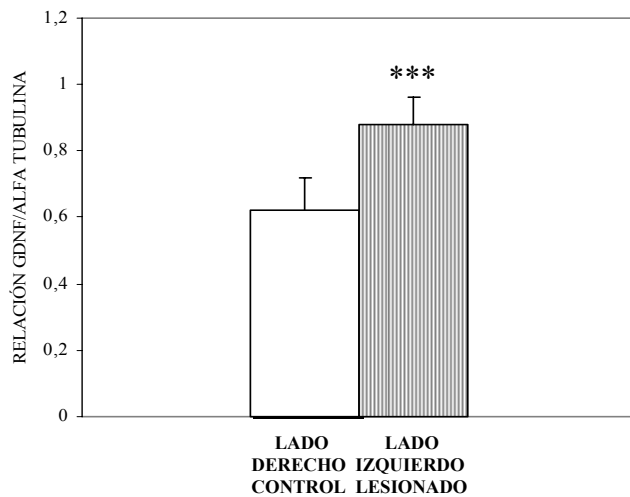


Figura 43. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la síntesis proteica de GDNF detectada mediante Western blot en el estriado (caudado) del grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA y posteriormente tratadas i.p. con vitamina D. *** $p < 0.009$

El estudio inmunohistoquímico indica un incremento de expresión proteica del factor neurotrófico GDNF en la sustancia negra del lado lesionado (figura 44A y B) del sistema nigroestriatal, respecto al lado no lesionado (figura 44A y C).

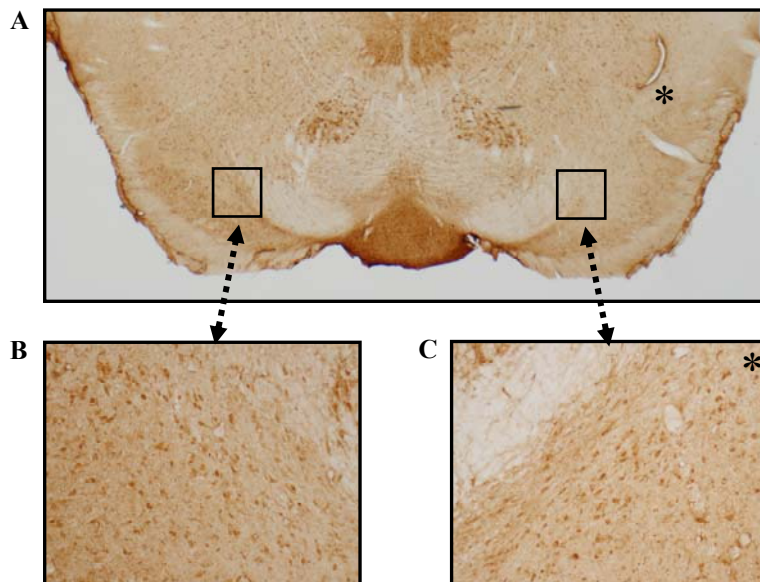


Figura 44. Inmunohistoquímica de GDNF en la sustancia negra (SN) del hemisferio ipsilateral y contralateral en el grupo de ratas lesionadas con la 6-OHDA y posteriormente tratadas i.p. con vitamina D. **A**, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, SN a mayor aumento de objetivo (10X), en el lado lesionado y no lesionado, respectivamente. El asterisco indica el lado no lesionado.

En el caudado del hemisferio izquierdo lesionado con la neurotoxina (figura 45A y B) también se detecta un incremento de la expresión del factor inductor de supervivencia celular GDNF con respecto al lado contralateral (figura 45A y C).

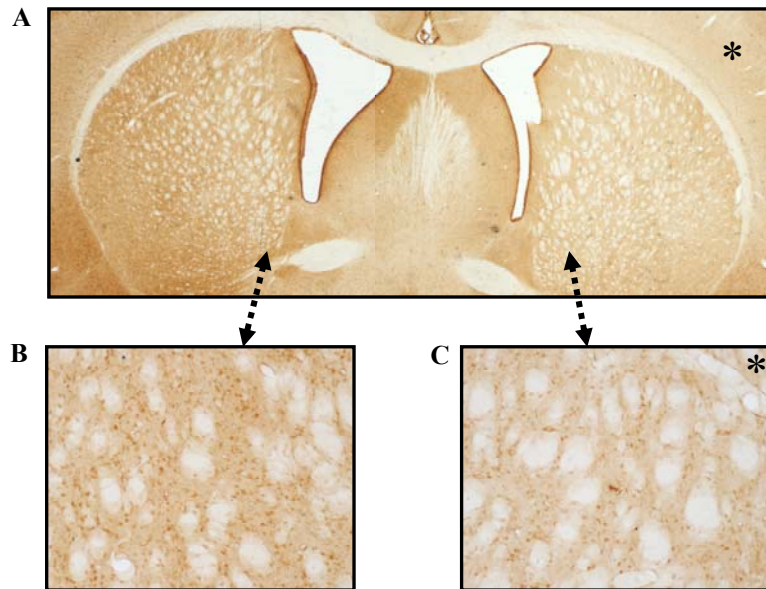


Figura 45. Inmunohistoquímica de GDNF en el estriado (caudado) del hemisferio ipsilateral y contralateral en el grupo de ratas lesionadas con la 6-OHDA y posteriormente tratadas con vitamina D i.p.. **A**, caudado a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, caudado a mayor aumento de objetivo (10X), en el lado lesionado y no lesionado, respectivamente. El asterisco indica el lado no lesionado.

1.2.4.3. Expresión proteica de TH.

La expresión de TH se ve claramente disminuida en el lado izquierdo de la sustancia negra (figura 46A y B), que es el lado en el que se inyectó la neurotoxina, si se compara con la inmunorreactividad para TH detectada en el lado contralateral y no lesionado (figura 46A y C), lo cual indica la existencia de una clara degeneración y muerte celular dopaminérgica inducida por la neurotoxina.

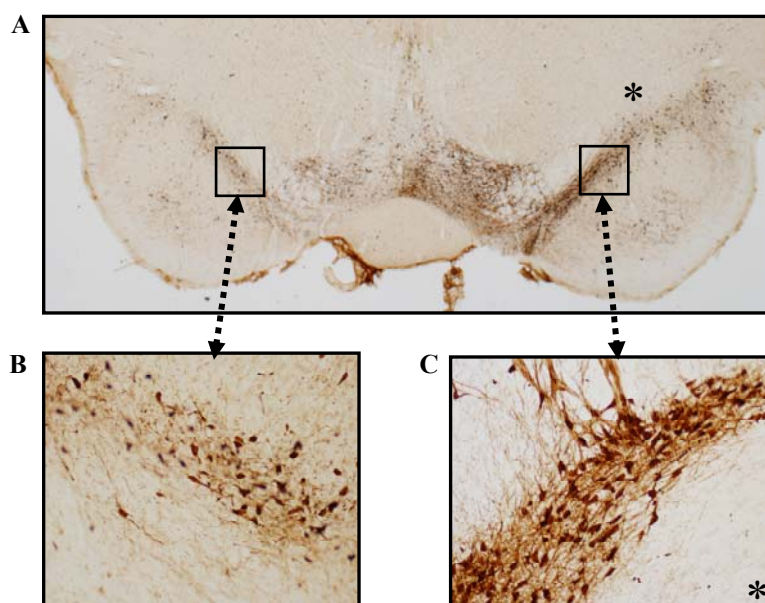


Figura 46. Inmuhistoquímica para TH en la sustancia negra (SN) del grupo de ratas lesionadas con la 6-OHDA y posteriormente tratadas i.p. con vitamina D. **A**, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, SN a mayor aumento de objetivo (10X) en el lado ipsilateral (**B**) y contralateral (**C**) a la lesión con 6-OHDA. El asterisco indica el lado no lesionado.

Como en los grupos de estudio anteriores, también se analiza la expresión de TH en las terminales dopaminérgicas del estriado, e igual que ocurre en la sustancia negra, ésta se ve disminuida en el lado lesionado al lado control (figura 47).



Figura 47. Inmunohistoquímica para TH en el estriado (caudado) del grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA y posteriormente tratadas i.p. con vitamina D. Aumento de objetivo 1.25 X. El asterisco indica el lado no lesionado.

1.2.5. Lesiones simuladas.

Para comprobar que el procedimiento quirúrgico no interfiere en la expresión de GDNF, se procedió a la inyección de ácido ascórbico siguiendo exactamente el mismo protocolo que en el resto de los grupos experimentales. A los 21 días de simular la lesión, también se cuantifica la expresión del ARNm y de la proteína de GDNF mediante las técnicas ya mencionadas.

1.2.5.1. Expresión de ARNm de GDNF.

La expresión de ARNm de GDNF en el caudado se detecta mediante RT-PCR, y las bandas obtenidas como productos de amplificación se cuantifican densitométricamente (figura 48 y 49). Los resultados obtenidos indican que no hay diferencias significativas de expresión de factor neurotrófico entre ambos lados, el que simula la lesión (0.76 ± 0.02) y el control de la lesión simulada (0.77 ± 0.03).

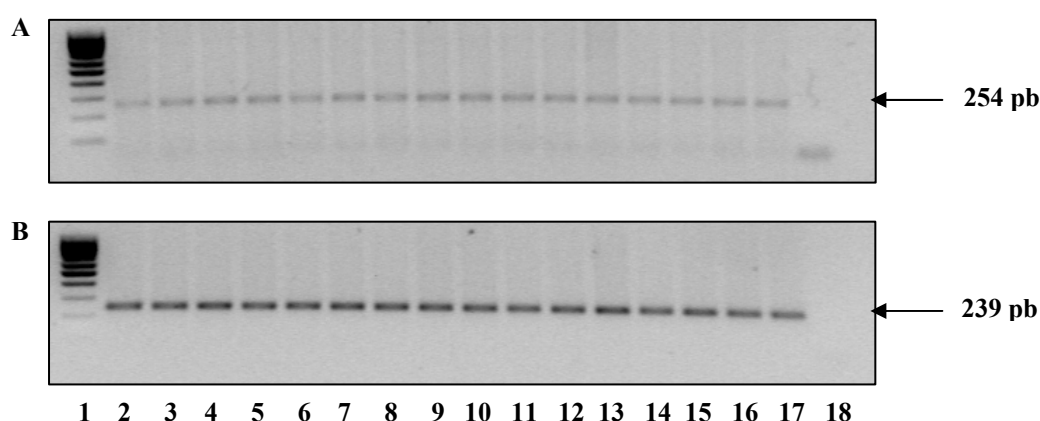


Figura 48. Efecto de la lesión simulada mediante la inyección unilateral estereotáxica de ácido ascórbico en el haz prosencefálico medial, sobre la expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión simulada. **(A)** Productos de PCR obtenidos para GDNF a partir del caudado (estriado) del hemisferio que simula la lesión. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión simulada; calles 3,5,7,9,11,12 y15: expresión de ARNm de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión simulada; calle 16: control negativo de PCR. **(B)** Productos de PCR obtenidos para GAPDH a partir del caudado (estriado) del hemisferio que simula la lesión. Calle 1: marcador de pesos moleculares; calles 2,4,6,8,10,12 y 14: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión simulada; calles 3,5,7,9,11,12 y15: expresión de ARNm de GAPDH en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión simulada; calle 16: control negativo de la PCR.

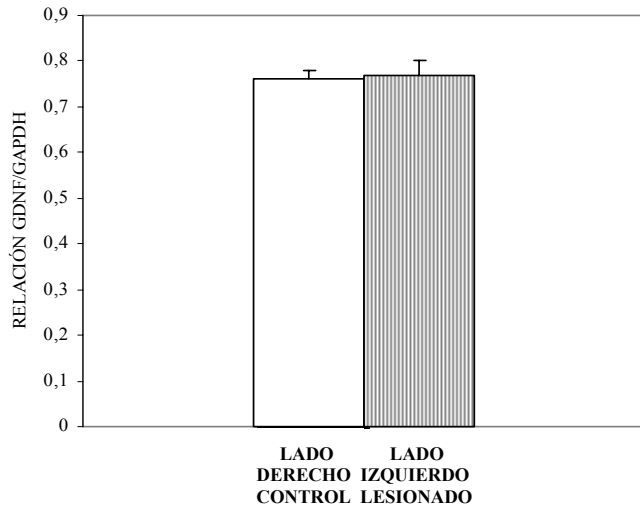


Figura 49. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de GDNF amplificado por RT-PCR en el estriado (caudado) del grupo de ratas con lesión simulada.

1.2.5.2. Expresión proteica de GDNF.

Además del estudio del ARNm, también se estudia el efecto de la lesión simulada sobre la síntesis proteica de GDNF (figura 50). Los resultados obtenidos a partir de la densitometría de las bandas obtenidas mediante Western blot (figura 51) indican nuevamente que el procedimiento estereotáxico no está influyendo en la síntesis proteica del factor neurotrófico, ya que no evidencias de expresión diferencial significativa entre ambos lados del caudado estriado (lado ipsilateral a la lesión simulada: 0.91 ± 0.09 ; lado contralateral: 0.86 ± 0.13).

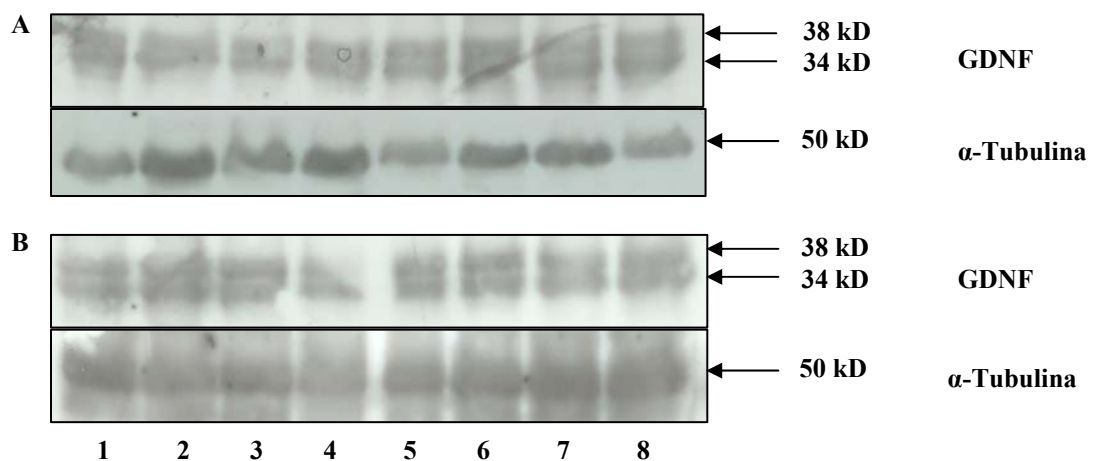


Figura 50. Efecto de la inyección unilateral estereotáxica de ácido ascórbico en el haz prosencefálico medial sobre la expresión proteica de GDNF en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión simulada. **(A)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio ipsilateral a la lesión simulada. **(B)** Western blot para GDNF y α -tubulina en el caudado (estriado) del hemisferio contralateral a la lesión simulada. Las bandas inmunorreactivas de 34 y 38 kD para GDNF y 50 kD para α -tubulina se indican mediante flechas.

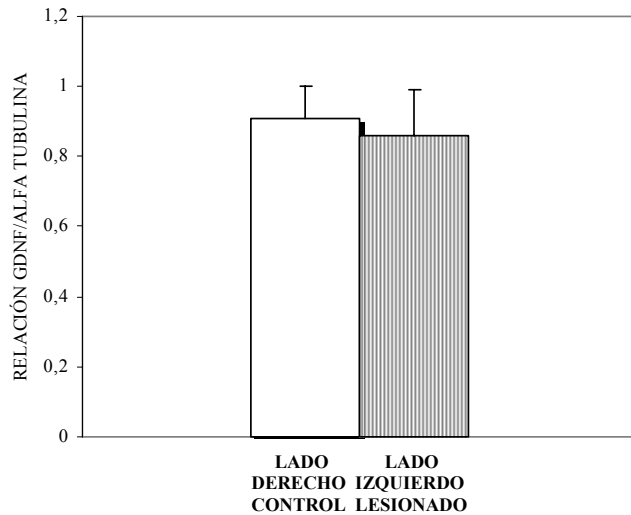


Figura 51. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la síntesis proteica de GDNF detectada mediante Western blot en el estriado (caudado) del grupo de ratas con lesión simulada.

Como cabía esperar, la inmunohistoquímica para GDNF en la sustancia negra (figura 52A, B y C) en este grupo de ratas inyectadas con ácido ascórbico en el hemisferio izquierdo cerebral, no evidenció diferencias de expresión entre ambos lados.

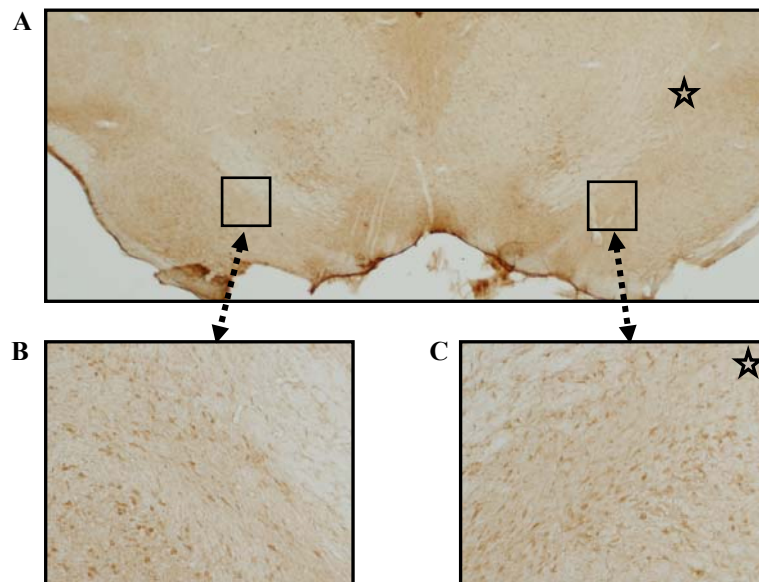


Figura 52. Inmunohistoquímica de GDNF en la sustancia negra (SN) del hemisferio ipsilateral y contralateral, en el grupo de ratas con lesión simulada. **A**, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, SN a mayor aumento de objetivo (10X), en el lado ipsilateral y contralateral a la lesión simulada, respectivamente. La estrella indica el lado contralateral a la lesión simulada.

La inmunohistoquímica para GDNF en el estriado (caudado) no muestra diferencias significativas de expresión del factor neurotrófico entre el lado ipsilateral y contralateral (figura 53A, B y C).

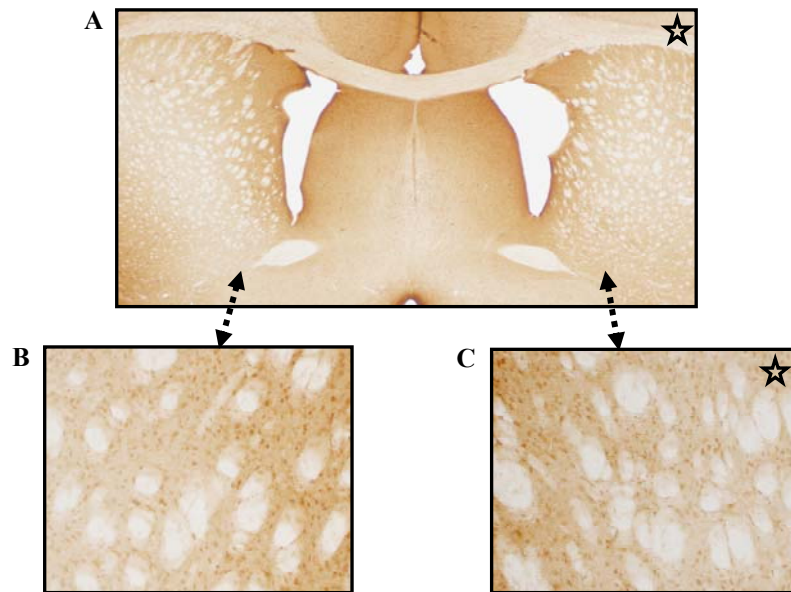


Figura 53. Inmunohistoquímica de GDNF en el estriado (caudado) del hemisferio ipsilateral y contralateral, en el grupo de ratas con lesión simulada. **A**, caudado a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, caudado a mayor aumento de objetivo (10X), en el lado ipsilateral y contralateral a la lesión simulada, respectivamente. La estrella indica el lado contralateral a la lesión simulada.

1.2.5.3. Expresión proteica de TH.

También se valora la expresión de TH en el caudado y la sustancia negra del grupo de animales con lesión simulada.

La inmunorreactividad para TH en la sustancia negra es idéntica en el hemisferio izquierdo que simula la lesión (figura 54A y B) con respecto al lado derecho del sistema nigroestriatal (figura 54A y C).

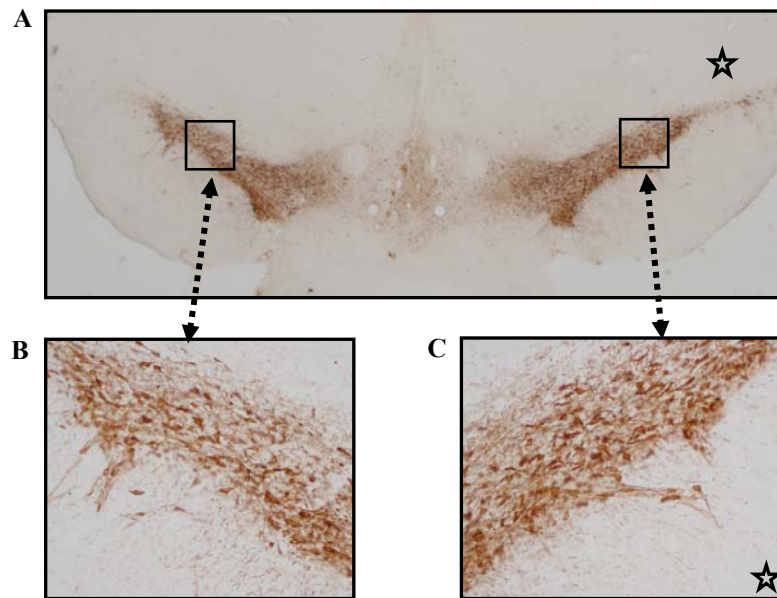


Figura 54. Inmunohistoquímica para TH en la sustancia negra (SN) del grupo de ratas con lesión simulada. **A**, SN a menor aumento de objetivo (1.25X). **B** y **C**, SN a mayor aumento de objetivo (10X) en el lado ipsilateral (**B**) y contralateral (**C**) a la lesión simulada. La estrella indica el lado contralateral a la lesión simulada.

En el estriado, la densidad de fibras dopaminérgicas es igual en ambos hemisferios, ipsilateral y contralateral a la lesión simulada (figura 55).



Figura 55. Inmunohistoquímica para TH en el estriado (caudado) del grupo de ratas con lesión simulada. Aumento objetivo 1.25 X. La estrella indica el lado contralateral a la lesión simulada.

1.2.6. Efecto del tratamiento i.p. con Vitamina D pre y post-lesión con 6-OHDA sobre la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa en las neuronas de la sustancia negra.

1.2.6.1. Lesión con 6-OHDA.

A las 3 semanas de inducir la lesión (figura 56A), los indicios de degeneración dopaminérgica en la sustancia negra son muy patentes, e implican tanto una reducción de la densidad de los somas (parte compacta de la sustancia negra) y de la arborización dendrítica (parte compacta y reticular de la sustancia negra), como cambios en la morfología celular de las neuronas dopaminérgicas; las células pasan de tener un soma circular a adquirir múltiples formas que van desde formas irregulares, en forma de media luna o triangulares y a veces incluso con distintas coloraciones (más claras u oscuras). Muchas de estas células dopaminérgicas están reducidas y/o encogidas posiblemente con pérdida del contenido citoplasmático y/o nuclear. Estos efectos afectan fundamentalmente al lado ipsilateral a la lesión, pero también se detectan, aunque con una menor repercusión, en el lado contralateral.

1.2.6.2. Tratamiento i.p. con Vitamina D pre-lesión y post-lesión con 6-OHDA.

La Vitamina D tiene un efecto preventivo (figura 56B) pero no recuperativo (figura 56C) de la degeneración neuronal dopaminérgica ipsilateral a la lesión generada por la neurotoxina en la sustancia negra.

La administración de Vitamina D (lado contralateral figuras 56B y C), en comparación con el control que supone la lesión simulada (figura 56D, en el lado contralateral), también induce una mayor arborización dendrítica neuronal, así como la expresión de TH, ya que tanto en el pretratamiento con vitamina D antes de lesionar, como en el postratamiento con vitamina D tras lesionar se detecta una mayor intensidad en la inmunorreactividad para TH.

1.2.6.3. Lesión simulada.

La inyección de ácido ascórbico en la vía nigroestriatal no provocó cambios en la densidad, ni en la morfología de las neuronas de la sustancia negra inmunorreactivas para TH, respecto al lado control contralateral (figura 56D).

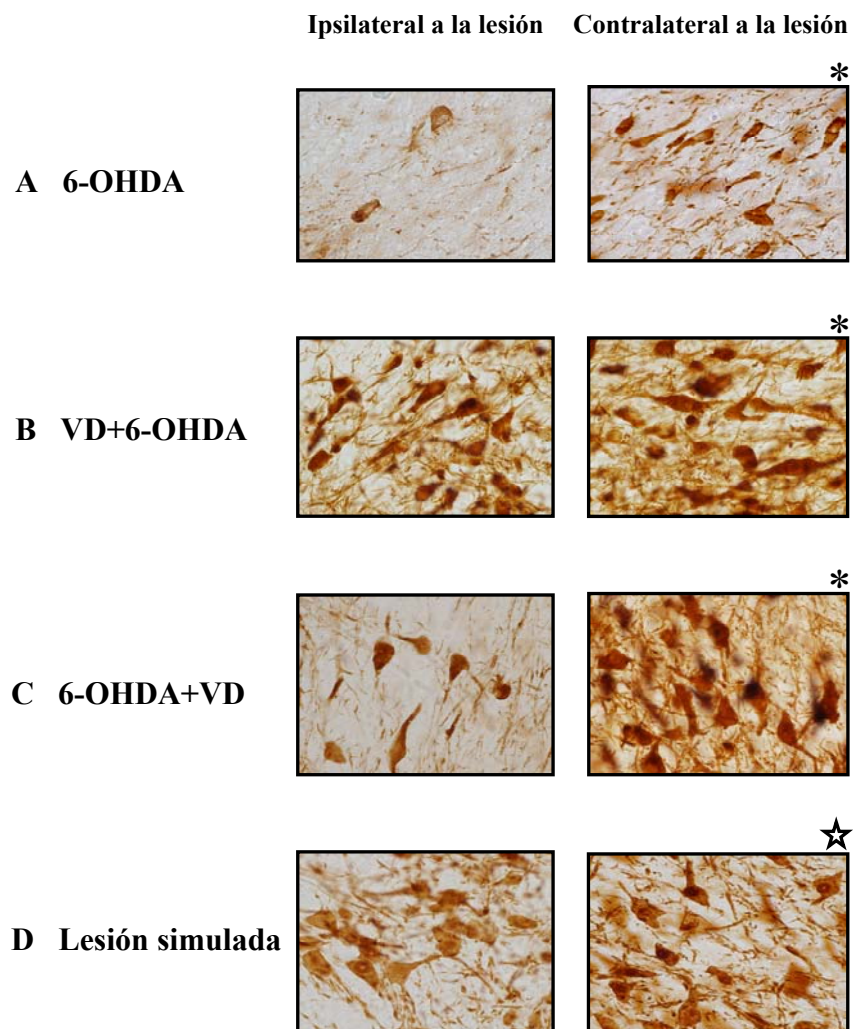


Figura 56. Morfología celular de las neuronas TH positivas en la sustancia negra del hemisferio izquierdo (ipsilateral a la lesión) y derecho (contralateral) en los grupos de ratas **(A)** lesionadas con 6-OHDA, **(B)** pretratadas i.p. con vitamina D antes de lesionar, **(C)** tratadas i.p. con vitamina D tras lesionar y **(D)** con lesión simulada. Aumento objetivo 40X. El asterisco y la estrella indican el hemisferio contralateral a la lesión o a la lesión simulada, respectivamente.

2. ESTUDIO *IN VITRO*.

2.1. Efecto de la administración de Vitamina D sobre la expresión de GDNF *in vitro* en cultivos primarios neuronales.

Los cultivos primarios neuronales (DIV11) obtenidos a partir de los caudados neonatales de rata, también se someten al tratamiento con la vitamina D, de este modo se podrá saber si *in vitro* la población neuronal del estriado puede ver modulada la expresión del factor neurotrófico GDNF cuando se administra la hormona.

En primer lugar, y antes de someter a las células al tratamiento con la vitamina, se comprueba el grado de pureza neuronal del cultivo; para ello se realiza una inmunohistoquímica para los marcadores proteicos de las células gliales y microglia, GFAP (figura 57A) y CD68 (figura 57B), respectivamente. Aproximadamente, la población glial representa un 20% del cultivo, mientras que no se detecta la presencia de células de la microglia.

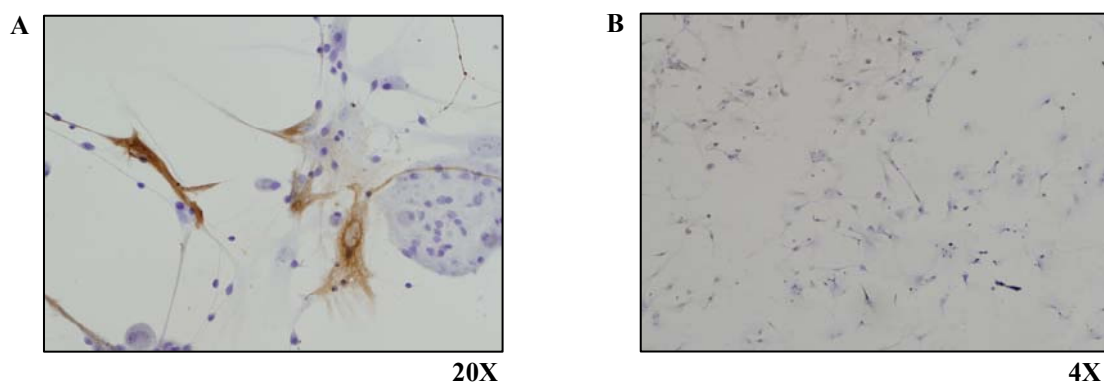


Figura 57. Inmunohistoquímica de los marcadores proteicos GFAP (A) y CD68 (B) en cultivos primarios neuronales de rata.

Para realizar este estudio, en primer lugar se realizó una curva dosis-respuesta con dosis crecientes de vitamina D (desde 1 nM a 1 μ M), y otra curva tiempo-respuesta, que permite valorar el efecto de la vitamina D a lo largo del tiempo (desde 12 hasta 72 horas después de ser administrada); de esta manera se detecta cuáles son la dosis y el tiempo de actuación efectivos de la vitamina D, a partir de los cuales la hormona ya ejerce su efecto modulador de la expresión de GDNF.

2.1.1. Curva Dosis-Respuesta.

Los cultivos neuronales (DIV11) son sometidos al tratamiento con distintas dosis de vitamina D: 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M, durante 48 horas, para luego analizar los niveles de expresión del ARNm (figuras 58 y 59) y proteína de GDNF (figuras 60 y 61).

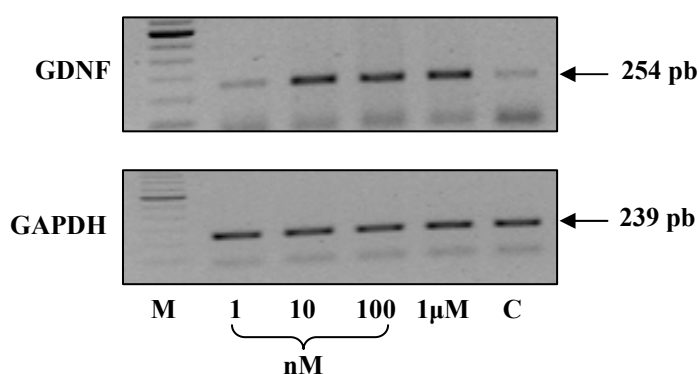


Figura 58. Expresión del ARNm de GDNF y de GAPDH mediante RT-PCR en cultivos neuronales tratados con distintas concentraciones de vitamina D (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M). M: marcador de pesos moleculares. C: control no tratado con vitamina D.

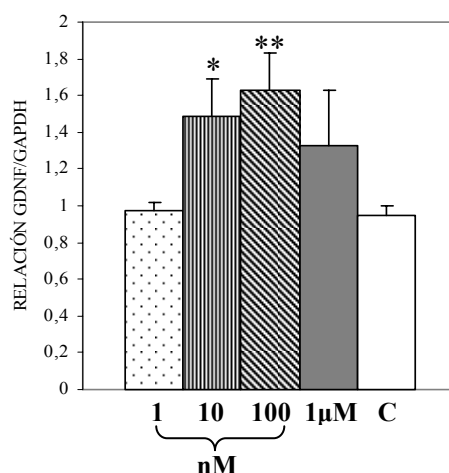


Figura 59. Datos obtenidos a partir del análisis densitométrico de las bandas de GDNF amplificadas mediante RT-PCR en cultivos neuronales tratados con distintas concentraciones de vitamina D.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Los valores obtenidos de la densitometría (figura 59) indican que la vitamina D incrementa la expresión de ARNm de GDNF de las neuronas del estriado en cultivo a partir de la dosis 10 nM (1.49 ± 0.20), siendo máxima a dosis 100 nM (1.63 ± 0.20), en relación a las células control tratadas con el vehículo (0.95 ± 0.05). A partir de la dosis 1 μ M (1.33 ± 0.30), la expresión de GDNF comienza a disminuir.

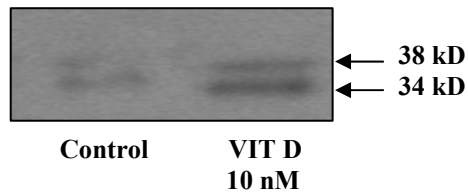


Figura 60. Síntesis proteica de GDNF obtenida mediante Western blot en cultivos neuronales tratados con vitamina D 10 nM. C: control no tratado con vitamina D.

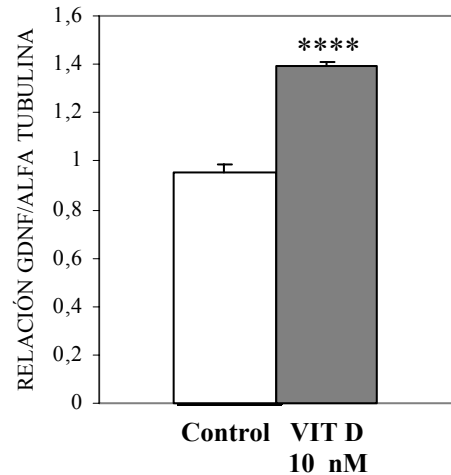


Figura 61. Datos obtenidos a partir del análisis densitométrico de las bandas de GDNF obtenidas mediante Western blot en cultivos neuronales tratados con vitamina D 10 nM. **** $p < 0.0001$

La administración de vitamina D a las neuronas en cultivo también modula la síntesis proteica de GDNF de forma dosis-dependiente (como se aprecia en la figura 61) respecto a las células control, tratadas con etanol. Además, el efecto de vitamina D es mucho más significativo ($P < 0.0001$) a nivel proteico que a nivel de expresión de ARNm (Control: 0.95 ± 0.04 ; VIT D: 1.39 ± 0.02).

2.1.2. Curva Tiempo-Respuesta.

Los cultivos neuronales (DIV11) fueron sometidos al tratamiento con vitamina D 10 nM durante distintos tiempos (12, 24, 48 y 72 horas) para nuevamente analizar los niveles de ARNm (figuras 62 y 63) y proteína de GDNF (figuras 64 y 65).

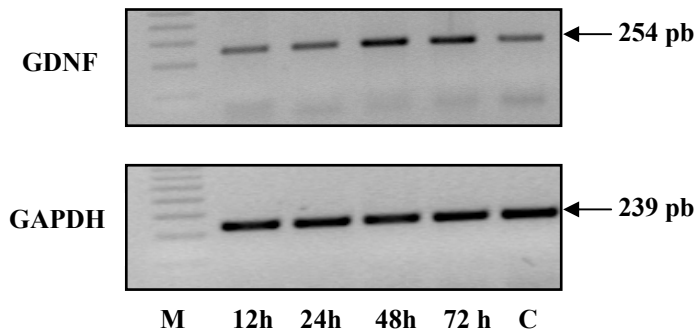


Figura 62. Expresión del ARNm de GDNF y GAPDH obtenida mediante RT-PCR en cultivos neuronales tratados con vitamina D durante 12, 24, 48 y 72 horas. M: marcador de pesos moleculares. C: control, no tratado con vitamina D.

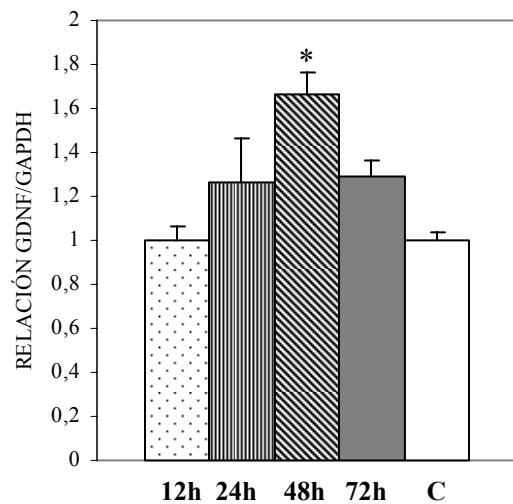


Figura 63. Datos obtenidos a partir del análisis densitométrico de las bandas de GDNF obtenidas mediante RT-PCR en cultivos primarios neuronales tratados con vitamina D durante 12, 24, 48 y 72 horas, respecto a los cultivos control. * $p < 0.05$

De acuerdo con la densitometría de las bandas del producto de PCR, la vitamina D estimula la expresión del ARNm de GDNF a lo largo del tiempo, siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) respecto a las neuronas control (1.01 ± 0.04), a las 48 horas de ser administrada a las células en cultivo (1.66 ± 0.10) (figura 63).

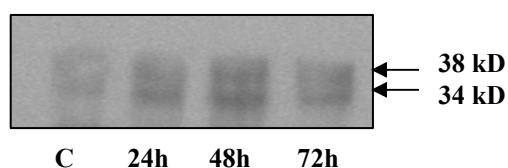


Figura 64. Síntesis proteica de GDNF obtenida mediante Western blot en cultivos neuronales tratados con vitamina D 10 nM durante 24, 48 y 72 horas.

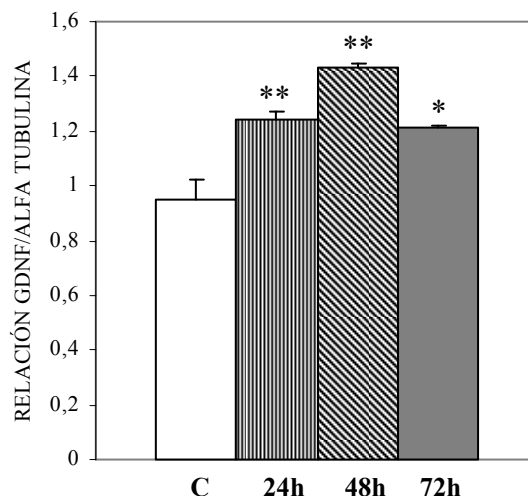


Figura 65. Datos obtenidos a partir del análisis densitométrico de las bandas del Western blot de GDNF a partir de cultivos neuronales tratados con vitamina D 10 nM durante 24, 48 y 72 horas.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Igualmente, según la densitometría de las bandas obtenidas mediante Western blot (figuras 64), la vitamina D incrementa la expresión proteica de GDNF de las células en cultivo a partir de las 24 horas (1.24 ± 0.03), siendo máxima a las 48 horas de haber sido añadida al cultivo (1.43 ± 0.02) (figura 14), en relación a las células control (0.95 ± 0.07), tal y como refleja el resultado obtenido a nivel de ARNm. A partir de las 72 horas de incubación con la vitamina D, la expresión de GDNF (1.21 ± 0.01) comienza a disminuir con respecto a las 24 y 48 horas.

2.1.3. Expresión de ARNm de GDNF.

Una vez establecidos la dosis y el tiempo efectivos del tratamiento con la vitamina D (10 nM, 48 h), se determinan los niveles de expresión del ARNm de GDNF (figura 65), a partir de distintos cultivos primarios neuronales (DIV11).

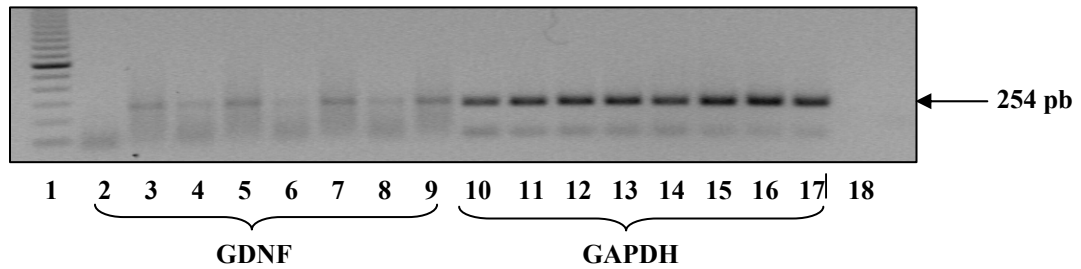


Figura 65. Expresión del ARNm de GDNF y GAPDH en cultivos primarios neuronales tratados con vitamina D 10 nM durante 48 horas. Calle 1: marcador de pesos moleculares. Calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16: cultivos primarios control. Calles 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17: cultivos tratados con vitamina D. Calle 18: control negativo de PCR.

Los valores obtenidos por densitometría (figura 66) muestran un incremento significativo de la expresión del ARNm de GDNF ($P < 0.01$), en las neuronas tratadas con vitamina D (0.43 ± 0.10) respecto a las neuronas control (0.18 ± 0.03).

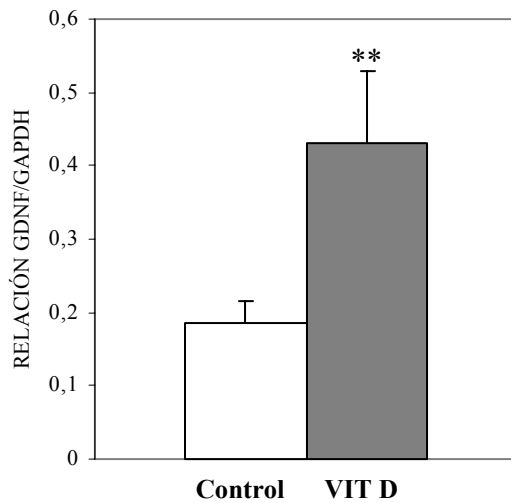


Figura 66. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la expresión de ARNm de GDNF en cultivos neuronales tratados con vitamina D 10 nM durante 48 horas, respecto a las neuronas control. ** $p < 0.01$

2.1.4. Expresión proteica de GDNF.

También se evaluó la expresión proteica de GDNF a partir de las neuronas en cultivo (DIV 11) como se muestra en la figura 67.

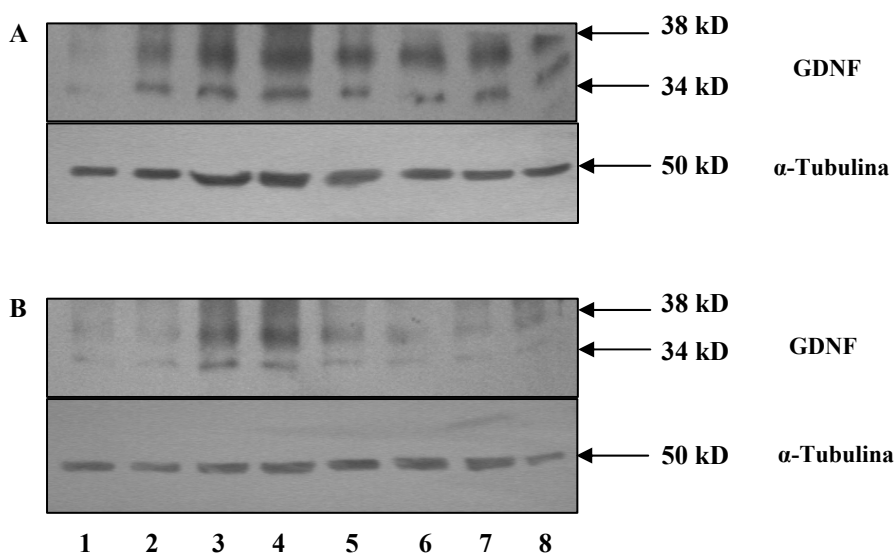


Figura 67. Síntesis proteica de GDNF y del control de carga interno α -tubulina en neuronas de cultivo primario tratadas con vitamina D 10 nM durante 48 horas (A), respecto a las neuronas control (B). Cada calle (1-8) corresponde a un cultivo primario independiente.

Los valores obtenidos a partir del análisis densitométrico (figura 67) muestran un incremento significativo ($P < 0.002$) de la expresión de la proteína GDNF en las neuronas en cultivo tratadas con vitamina D (0.67 ± 0.08), respecto a los neuronas control (0.46 ± 0.10).

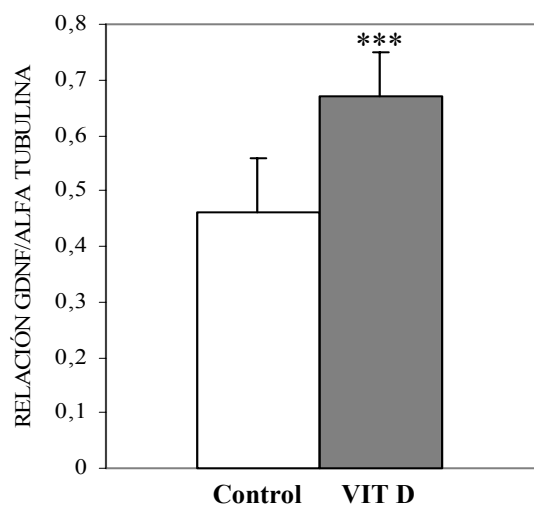


Figura 67. Resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico de la síntesis proteica detectada mediante Western blot en las neuronas tratadas con vitamina D 10 nM durante 48 horas, respecto a las neuronas control. *** $p < 0.002$

2.2. Efecto de la neurotoxina 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) sobre la viabilidad celular y la expresión de GDNF en cultivos primarios neuronales.

Además de estudiar el efecto de la neurotoxina en el modelo de rata parkinsoniana, también se determinó el efecto de 6-OHDA sobre la supervivencia celular y la expresión de GDNF (ARNm y proteína) en los cultivos primarios neuronales del estriado.

2.2.1. Expresión de ARNm de GDNF.

Tras someter a los cultivos neuronales a distintas dosis, 50 y 100 μ M, y distintos tiempos de exposición a la neurotoxina (2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas), se determinó su efecto a nivel de ARNm de GDNF mediante RT-PCR. La expresión de GDNF comienza a incrementarse a partir de las 4 horas de exposición ante 6-OHDA, siendo máxima a las 4 y 6 horas, según se administre la neurotoxina a una concentración 50 o 100 μ M, respectivamente (figura 68); a partir de las 6 horas de exposición, la expresión de ARNm del factor neurotrófico comienza a disminuir. Aunque el efecto de 6-OHDA se detecta antes con la dosis más elevada, los resultados obtenidos para ambas concentraciones son prácticamente proporcionales.

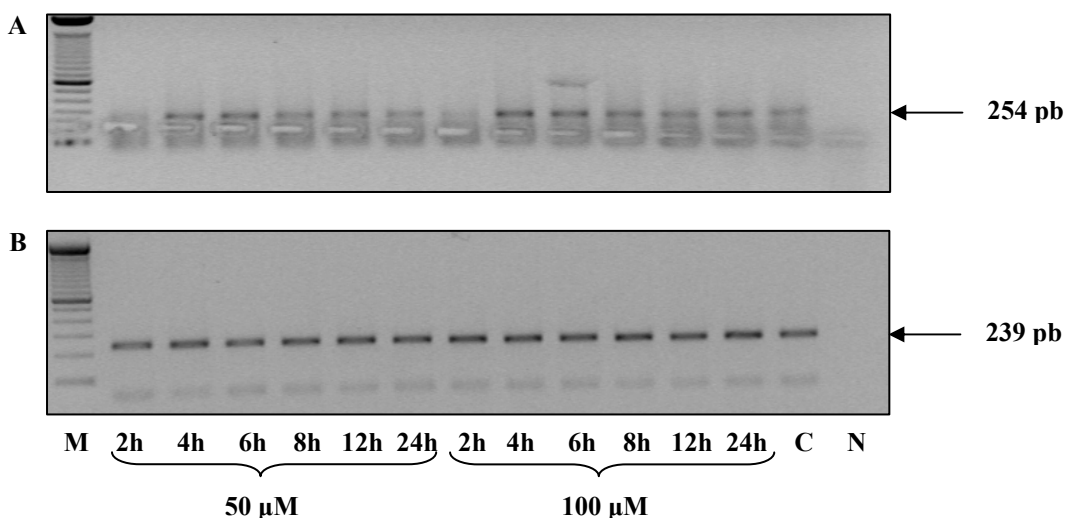


Figura 68. Efecto de 6-OHDA (50 y 100 μ M) sobre la expresión del ARNm de GDNF (A) y GAPDH (B) a las 2,4,6,8,12 y 24 horas después de haber sido administrada a las neuronas en cultivo. M: marcador de pesos moleculares. C: cultivo control, sin tratado con ácido ascórbico. N: control negativo de PCR.

Los valores que se obtienen por densitometría muestran que la administración de 6-OHDA a las neuronas en cultivo induce un incremento significativo ($P<0.01$) de la expresión de ARNm de GDNF a las 6 horas de exposición con una dosis 50 μ M (Control: 0.50 ± 0.08 ; 6 h: 0.73 ± 0.10), y a las 4 horas de exposición cuando la dosis es 100 μ M (Control: 0.45 ± 0.07 ; 4 h: 0.67 ± 0.04) en relación a las células control no tratadas con la neurotoxina (figura 69).

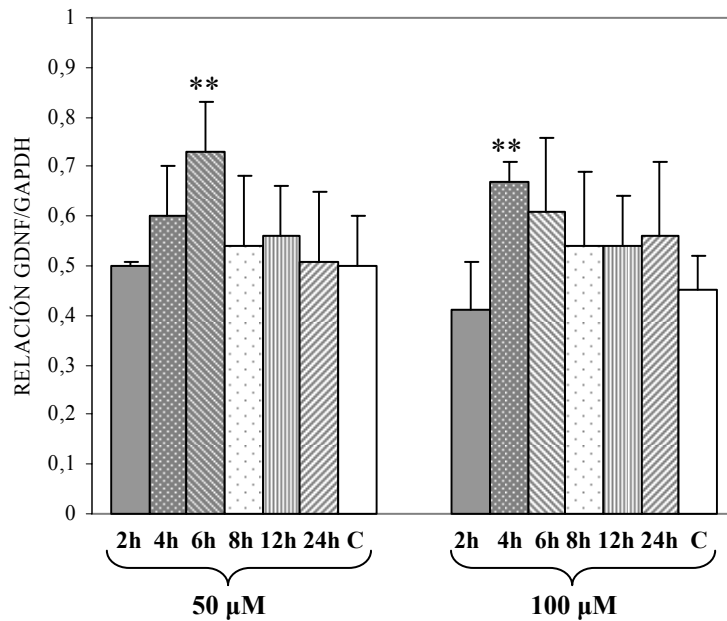


Figura 69. Densitometría de las bandas obtenidas mediante RT-PCR a partir de cultivos neuronales sometidos al efecto de distintos tiempos de actuación ante 6-OHDA (2,4,6,8,12 y 24 horas). ** $p<0.01$

2.2.2. Expresión proteica de GDNF.

También se valoró el efecto de la administración del tóxico 6-OHDA (50 μ M) sobre la expresión proteica de GDNF en los cultivos neuronales mediante la técnica de Western blot, a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de exposición (figura 70).

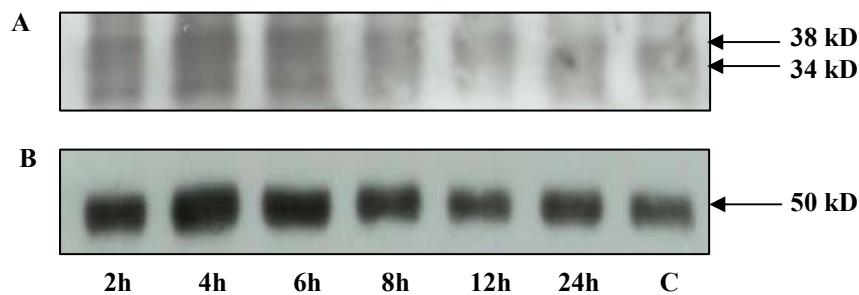


Figura 70. Expresión proteica de GDNF (A) y α -tubulina (B) en cultivo primario neuronal tras administrar la neurotoxina 6-OHDA 50 μ M a distintos tiempos de exposición (2,4,6,8,12 y 24 horas).

Los resultados obtenidos de la densitometría de las bandas de 34 y 38 kD para GDNF, y de 50 kD para α -tubulina, indican que la expresión de GDNF aumenta significativamente ($P<0.01$) a las 6 horas de administrar 6-OHDA al cultivo neuronal (0.53 ± 0.07) en relación a las células control (0.31 ± 0.05); a partir de las 8 horas de exposición de los cultivos neuronales ante la neurotoxina (0.43 ± 0.06), la expresión de GDNF comienza a disminuir (figura 71).

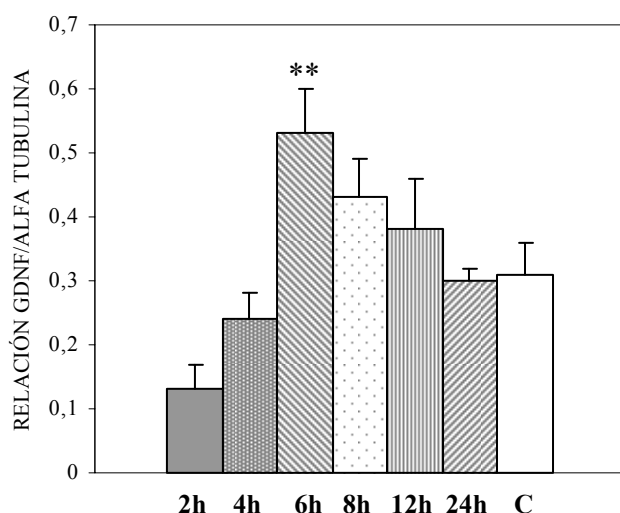


Figura 71. Densitometría de las bandas obtenidas mediante Western blot a partir de cultivos neuronales sometidos al efecto de distintos tiempos de exposición ante 6-OHDA (2,4,6,8,12 y 24 horas). ** $p<0.01$

2.2.3. Ensayo de Supervivencia Celular (MTT).

El ensayo de supervivencia celular indica cómo la exposición de las neuronas en cultivo ante 6-OHDA 50 y 100 μ M, induce la muerte celular (figura 72); a medida que transcurre el tiempo, disminuye la absorbancia y por lo tanto, el número de células vivas (efecto máximo a las 24 horas de administrar 6-OHDA). Dosis mayores de 6-OHDA (100 μ M) reducen más el número de células vivas y en menos tiempo.

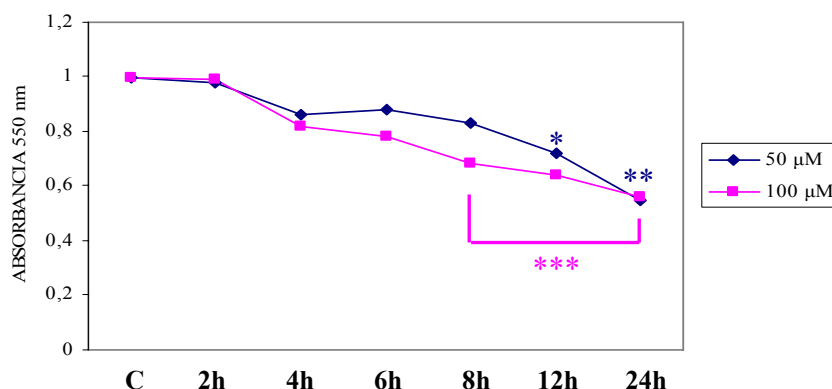


Figura 72. Ensayo de supervivencia celular tras someter los cultivos neuronales a distintos tiempos de exposición (2,4,6,8,12 y 24 horas) con 6-OHDA a las dosis 50 y 100 μM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

La disminución del número de células en cultivo, es decir, la mortalidad celular es significativa a las 12 ($P < 0.05$) y 24 horas ($P < 0.001$) de exposición ante 6-OHDA 50 μM (Control: 1; 12 h: 0.72 ± 0.10 ; 24 h: 0.55 ± 0.10), y a las 8, 12 y 24 horas ($P < 0.001$) de exposición ante 6-OHDA 100 μM (Control: 1; 8 h: 0.68 ± 0.10 ; 12 h: 0.64 ± 0.10 ; 24 h: 0.56 ± 0.05) en relación a las neuronas control (figura 72).

2.3. Efecto de la administración previa de Vitamina D a la neurotoxina 6-OHDA.

En los cultivos primarios neuronales, también se estudió el efecto de la vitamina D (10 nM) administrada previamente a la toxina 6-OHDA (50 μM), sobre la expresión del ARNm de GDNF mediante RT-PCR (figura 73). Las neuronas pretratadas con vitamina D se sometieron al efecto de distintos tiempos de exposición de 6-OHDA (2, 6, 12 y 24 horas).

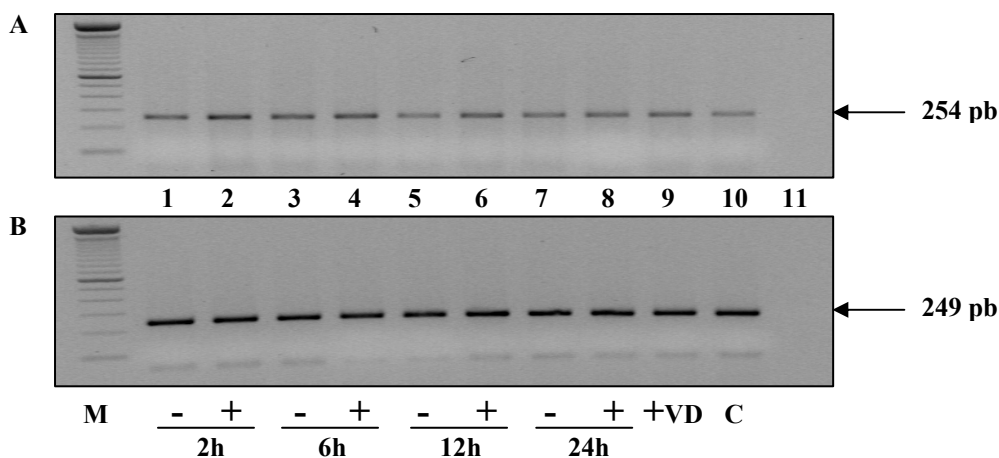


Figura 73. RT-PCR de GDNF (A) y GAPDH (B) en cultivos primarios neuronales pretratados con vitamina D (10 nM) y posteriormente lesionados con 6-OHDA 50 μ M durante 2, 6, 12 y 24 horas. M: Marcador de pesos moleculares. Calles 1,3,5 y 7: neuronas expuestas ante 6-OHDA (2,6,12 y 24 horas). Calles 2,4,6 y 8: neuronas pretratadas con vitamina D y expuestas ante 6-OHDA (2,4,6,12 y 24 horas). Calle 9: neuronas tratadas con vitamina D 10 nM. Calle 10: células control, no tratadas con vitamina D ni con 6-OHDA. Calle 11: control negativo RT-PCR.

Los valores obtenidos de la densitometría de las bandas obtenidas mediante RT-PCR se visualizan en el gráfico representado en la figura 74. La vitamina D incrementa de forma significativa ($p < 0.001$) la expresión del ARNm de GDNF de las neuronas en cultivo en relación a las neuronas control (Control: 0.52 ± 0.02 ; VIT D: 0.82 ± 0.06). Las neuronas en cultivo sometidas al pretratamiento con vitamina D y posteriormente tratadas con 6-OHDA incrementan de forma significativa ($P < 0.001$) la expresión de ARNm de GDNF respecto a las neuronas control (Control: 0.52 ± 0.02 ; 2 h (VIT D + 6-OHDA): 0.83 ± 0.07 ; 6 h (VIT D + 6-OHDA): 0.75 ± 0.04 ; 12 h (VIT D + 6-OHDA): 0.75 ± 0.08 ; 24 h (VIT D + 6-OHDA): 0.71 ± 0.02). Las neuronas no sometidas al pretratamiento y tratadas con 6-OHDA también incrementan la expresión del ARNm de GDNF, pero este incremento es significativo ($P < 0.001$) a las 24 horas de administrar 6-OHDA (Control: 0.52 ± 0.02 ; 2 h: 0.58 ± 0.08 ; 6 h: 0.65 ± 0.06 ; 12 h: 0.73 ± 0.04 ; 24 h: 0.61 ± 0.06).

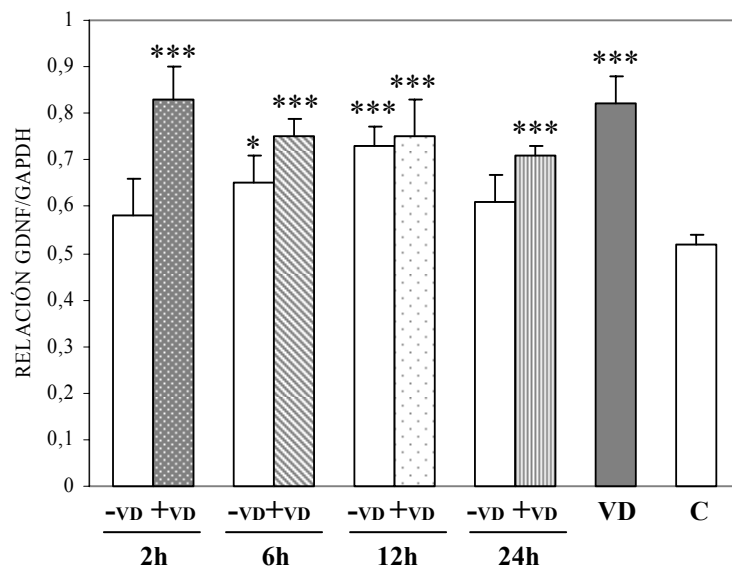


Figura 74. Densitometría de las bandas obtenidas mediante RT-PCR a partir de cultivos neuronales sometidos al pretratamiento con vitamina D 10 nM y distintos tiempos de exposición con 6-OHDA 50 μ M (2,6,12 y 24 horas). *p<0.05, ***p<0.001

6. DISCUSIÓN

1. EFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA EXPRESIÓN DE GDNF EN EL ESTRIADO (CAUDADO).

El *Factor Neurotrófico derivado de la Glia* o *GDNF* es un factor conocido por su potente efecto trófico sobre la población neuronal dopaminérgica, aunque también actúa sobre otras poblaciones neuronales (Connor y Dragunow, 1998; Siegel y col., 2000). GDNF induce la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en cultivos primarios mesencefálicos de embrión de rata y diferenciación morfológica de las neuronas productoras de tirosina hidroxilasa (Lin y col., 1993). Además, este factor también actúa en el establecimiento del sistema dopaminérgico nigroestriatal durante el desarrollo e induciendo la supervivencia y expansión de injertos estriatales (Siegel y col., 2000; López-Martín y col., 1999). De este modo, durante el desarrollo fisiológico, los terminales axonales nigroestriatales se dirigen y concentran en el área estriatal, donde se encuentran los niveles más elevados de GDNF, e igualmente cuando se establecen coinjertos estriatales y mesencefálicos intraestriatales, tanto los somas como las fibras de las neuronas dopaminérgicas se concentran en aquellas regiones en las que los niveles de GDNF son máximos (López-Martín y col., 1999). GDNF también posee efectos neuroprotectores según se ha comprobado en modelos animales de la Enfermedad de Parkinson inducida por neurotoxinas tales como 6-hidroxidopamina y MPTP (Tomac y col., 1995; Gash y col., 1996; Kirik y col., 2000). Por tanto, GDNF se podría considerar un agente terapéutico idóneo en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, sin embargo su elevado peso molecular dificulta el acceso al parénquima cerebral ya que la barrera hematoencefálica supone una gran restricción de entrada. Teniendo esto en cuenta, la vía de administración únicamente puede ser intracerebral directa, a través de vectores virales integradores del gen de GDNF, o bien, mediante el implante de células, injertos o estructuras semipermeables secretoras del factor neurotrófico.

La administración de GDNF en el estriado tiene un efecto protector significativo tanto sobre las proyecciones axonales y su función motora, como sobre los somas celulares de las neuronas dopaminérgicas, mientras que la inyección intranigral únicamente tiene un efecto protector de los cuerpos celulares de la sustancia negra. El rescate de los cuerpos neuronales dopaminérgicos en la sustancia negra, en ausencia de inervación estriatal funcional, es insuficiente para preservar y/o recuperar las funciones motoras en las que está implicado el estriado. En cualquier caso, la efectividad del tratamiento con GDNF en distintos modelos de lesión parkinsonianos, depende

del tiempo y lugar de administración del factor neurotrófico, así como del tipo de lesión utilizado. La técnica experimental y vía de administración descritos previamente resultan bastante complejas, invasivas y/o generadoras de efectos secundarios indeseables. Por esta razón, sería interesante establecer nuevas terapias alternativas más prácticas y que conlleven menos riesgos.

Una nueva aproximación terapéutica fue la creación de la proteína de fusión recombinante llamada *Tat-GDNF*, integrada por la proteína GDNF y un péptido derivado de la proteína *Tat* de fusión del virus VIH (Dietz y col., 2003). La composición estructural de esta proteína recombinante de fusión es la que permite que GDNF pueda ser administrado sistémicamente, y que éste llegue a los tejidos diana de forma específica, donde actúa protegiendo a las células de daños mecánicos (Kilic y col., 2004) o inducidos por isquemia (Kilic y col., 2003). En el modelo de ratones parkinsonianos lesionados con la neurotoxina MPTP (Dietz y col., 2006), la inyección intraperitoneal de la proteína *Tat-GDNF* incrementa la detección del factor neurotrófico en la parte compacta de la sustancia negra a las 4 horas de ser administrada, pero no previene la degeneración dopaminérgica de la sustancia negra característica de la Enfermedad de Parkinson. Posiblemente la aplicación de dosis más elevadas de la proteína *Tat-GDNF*, la vía de administración intracerebral respecto a la intraperitoneal o la acción sinérgica de *Tat-GDNF* junto a otras proteínas de fusión antiapoptóticas como *Tat-Bcl-Xl*, sean aspectos que haya que tener en cuenta en un futuro para mejorar su efectividad como posible tratamiento antidegenerativo.

Otra alternativa terapéutica antiparkinsoniana es la que se propone en este trabajo. Se trata de un método práctico y nada invasivo que consiste en la modulación exógena de la expresión del gen de GDNF en el estriado, mediante la administración sistémica de vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) de acuerdo al modelo descrito por Wang y colaboradores (Wang y col., 2000). La vitamina D es una hormona que por su naturaleza secoesteroidea es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que le permite desempeñar un papel esencial en el desarrollo del sistema nervioso central durante la etapa embrionaria y neonatal, y en el mantenimiento de la función del cerebro adulto debido a su capacidad de modular la expresión de los factores neurotróficos (incrementa la expresión de NGF, NT-3 y GDNF, inhibe la de NT-4) que ejercen un papel neuroprotector. Los efectos de vitamina D están mediados por el receptor de vitamina D (VDR), el cual se expresa en múltiples regiones del cerebro embrionario y adulto (Prüfer y col., 1999;

Veenstra y col., 1998). El complejo ligando-receptor [1,25(OH)₂D₃-VDR] puede actuar como un factor de transcripción dependiente de ligando cuando interacciona con los elementos de respuesta a vitamina D (VDREs) localizados en la región reguladora de los genes diana. La relevancia de GDNF, y su relación con vitamina D, queda de manifiesto en ratas neonatales nacidas de madres alimentadas con una dieta deficiente en vitamina D (Eyles y col., 2003). Esta carencia vitamínica es responsable de la inhibición de la expresión de GDNF y NGF y la subsiguiente generación de trastornos en el desarrollo cerebral. Anteriormente, Naveilhan y colaboradores (Naveilhan y col., 1996) ya habían demostrado que la administración de vitamina D a los cultivos de la línea celular de glioma de rata C6, incrementaba la expresión de los transcritos de GDNF. También el grupo de Wang y colaboradores (Wang y col., 2000) verificó en el efecto estimulador de la administración intraperitoneal de vitamina D (1ug/kg) en ratas con isquemia cerebral sobre la expresión de GDNF cortical, el cual actúa reduciendo el grado de lesión cerebral.

Teniendo en cuenta la acción de vitamina D a nivel cerebral, nuestro primer objetivo fue comprobar si también modula la expresión de GDNF en el caudado (estriado), núcleo al que llegan los terminales axonales dopaminérgicos procedentes de la sustancia negra y sobre los cuales podría actuar directamente el factor neurotrófico manteniendo la integridad de la vía nigroestriatal afectada en trastornos neurodegenerativos como la enfermedad del Parkinson. Para ello, un grupo de animales se sometieron al tratamiento i.p. con vitamina D (1ug/kg) durante 7 días consecutivos, respecto a un grupo control al que se le administró i.p. solución salina. Transcurrido este tiempo, a partir del ARN del estriado y utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia que codifica para GDNF, amplificamos mediante PCR una región de 254 pb que corresponde a GDNF, tal y como confirma el análisis de restricción. Además, también analizamos la expresión proteica del factor neurotrófico en el estriado mediante Western blot. Esta técnica detecta dos bandas inmunorreactivas de 34 y 38 kD en el extracto proteico obtenido del estriado. Ambas técnicas permitieron detectar un incremento significativo de los niveles de ARNm y proteína de GDNF a partir del estriado obtenido de animales tratados i.p. con vitamina D, respecto al grupo control.

Una vez analizado el efecto de la administración i.p. de vitamina D *in vivo*, el siguiente paso fue determinar si la expresión de GDNF de la población neuronal del estriado es susceptible de ser regulada por vitamina D en cultivos primarios neuronales de estriado. Para ello, en primer lugar se comprobó la pureza de estos cultivos mediante inmunohistoquímica para los marcadores

proteicos de las principales poblaciones en el sistema nervioso central: GFAP, marcador de las células gliales, y CD68, marcador de la microglia. La población glial representa aproximadamente un 20% del cultivo neuronal, y expresa el factor GDNF, no obstante, y de acuerdo con los resultados obtenidos en cultivos primarios de astrocitos, su expresión no está modulada por vitamina D (Naveilhan y col., 1996). Otros trabajos realizados en cultivos primarios mesencefálicos enriquecidos en neuronas y con una proporción mínima de células gliales, demuestra la necesidad de la existencia de estas células de soporte cuyo aporte trófico es esencial en el mantenimiento de la integridad neuronal, y por tanto del cultivo (Hou y col., 1997; Kramer y col., 1999). En cuanto a la microglia, los cultivos primarios neuronales carecen de inmunopositividad para CD68. Así pues, nuestro cultivo, fundamentalmente neuronal y de procedencia estriatal, fue sometido al tratamiento con distintas dosis y tiempos de tratamiento con vitamina D. A partir de estos estudios dosis y tiempo-respuesta, se escogió la dosis (10 nM) y el tiempo efectivos (48 horas) de tratamiento. Los resultados obtenidos mediante RT-PCR y Western blot mostraron que vitamina D incrementa la expresión de GDNF tanto a nivel de ARNm como de proteína en las neuronas de estriado en cultivo. Por tanto, es posible que vitamina D unida a VDR module la expresión del gen de GDNF directamente mediante la interacción con un elemento de respuesta a vitamina D situado en la región promotora del gen de GDNF, o bien, indirectamente, regulando la expresión de otros factores de transcripción intermediarios.

En resumen, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, vitamina D induce la expresión de ARNm y proteína de GDNF en el estriado, y específicamente son las neuronas de estriado de los cultivos primarios las que responden a la administración de la hormona induciendo así la expresión del factor neurotrófico de una forma dosis y tiempo dependiente. De este modo, posiblemente sea la población neuronal que integra el estriado, la que responde y es susceptible al tratamiento con vitamina D.

2. MODELO EXPERIMENTAL DE ANIMAL HEMIPARKINSONIANO INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN DE LA NEUROTOXINA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA).

2.1. Efecto de la neurotoxina 6-OHDA inyectada en el haz prosencefálico medial sobre la expresión de GDNF y tirosina hidroxilasa.

El método experimental más utilizado para estudiar la Enfermedad de Parkinson es la creación de modelos animales parkinsonianos mediante la inyección estereotáxica de neurotoxinas como 6-OHDA en distintas localizaciones del sistema nigroestriatal: intranigralmente, induciendo la degeneración de los cuerpos neuronales dopaminérgicos y secundariamente, de sus terminales axonales en el estriado (transporte anterógrado); en el haz prosencefálico medial donde se localizan las fibras nigroestriatales, de tal manera que 6-OHDA se transporta bidireccionalmente hacia la sustancia negra (retrógradamente) y el estriado (anterógradamente), o bien intraestriatalmente, de tal forma que la lesión comenzaría en la región terminal de los axones en el estriado y se dirigiría hacia los somas dopaminérgicos en la sustancia negra (transporte retrógrado). Los modelos de inyección intranigral o en el haz prosencefálico medial se utilizan normalmente en estudios de comportamiento, en experimentos farmacológicos y en trasplantes (Björklund y col., 1997). En cualquier caso, la neurotoxina es captada e internalizada en el medio intracelular a través del sistema de recaptura de dopamina de los receptores dopaminérgicos localizado fundamentalmente en la región axonal, y transportada retrógradamente induciendo la degeneración del soma neuronal en sustancia negra. 6-OHDA provoca lesión al inducir la producción de especies oxigénicas reactivas (ROS), peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y superóxido, y p-quinonas (Inden y col., 2005). La generación de ROS posiblemente provenga de la desaminación de la neurotoxina catalizada por la MAO y/o por su propia autooxidación al interaccionar con el oxígeno molecular (Brachet y col, 2005). Las propiedades toxicológicas de 6-OHDA implican por tanto la producción de ROS, su interacción con proteínas, ácidos nucleicos y el sistema de membranas celulares, así como la inhibición de los complejos mitocondriales I y IV. La relación de ROS y la Enfermedad de Parkinson queda de manifiesto en el cerebro de pacientes afectados por la enfermedad en el que se detectó un incremento de la peroxidación lipídica y por tanto, un aumento en los niveles de ROS, todo ello debido a la alteración del sistema de detoxificación celular, lo cual conlleva degeneración y muerte neuronal.

En este estudio, utilizamos un modelo animal parkinsoniano en el que 6-OHDA se inyecta estereotáxicamente en las fibras del haz prosencefálico medial, donde se localizan las fibras dopaminérgicas nigroestriatales, del hemisferio izquierdo cerebral. De este modo obtuvimos ratas hemiparkinsonianas con una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal que afecta a uno de los hemisferios del cerebro, mientras que el hemisferio contralateral, sirve de control de la lesión. También establecimos un grupo de ratas adicional con lesiones simuladas en el que no se inyectó 6-OHDA, sino el vehículo ácido ascórbico, siguiendo el mismo procedimiento experimental; de este modo, pudimos verificar si la propia inyección puede ejercer por sí sola algún efecto. La degeneración y muerte neuronal dopaminérgica implica la reducción del contenido de dopamina e hipersensibilidad postsináptica de los receptores dopaminérgicos en el estriado del hemisferio ipsilateral a la lesión, de tal forma que si se administra apomorfina, se induce la rotación asimétrica en sentido contralateral a la lesión (Stauton y col., 1981; LaHoste y Marshall, 1992). Teniendo esto en cuenta, tras lesionar los animales se comprobó que efectivamente la 6-OHDA actuaba específicamente induciendo la degeneración dopaminérgica mediante el estudio del comportamiento motor de la rata tras inyectar subcutáneamente apomorfina. Pudimos comprobar que el animal hemiparkinsoniano sigue un patrón motor rotatorio continuo y en sentido contralateral diferente al plan de movimiento aleatorio de una rata normal.

Como se ha comentado previamente, se conoce bastante bien el papel de GDNF sobre el sistema nigroestriatal lesionado: protege y repara las neuronas dopaminérgicas del daño mecánico o provocado por neurotoxinas, estimula el desarrollo axonal y crecimiento de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra lesionadas, y activa la liberación y recaptación de dopamina en aquellas neuronas afectadas por la lesión (Kirik y col., 2000). Por esta razón, una vez establecido el modelo animal parkinsoniano, nuestro segundo objetivo fue analizar los niveles de expresión de ARNm y proteína de GDNF en el sistema nigroestriatal (sustancia negra y estriado) del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión inducida por la inyección de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial. De este modo, se pueden comprobar los cambios adaptativos en la expresión de GDNF en el hemisferio en el que se generó la lesión, respecto al hemisferio control. En nuestro modelo experimental de la Enfermedad de Parkinson, no se detectaron diferencias significativas de expresión de ARNm que codifica GDNF en el caudado ipsilateral a la lesión, respecto al contralateral, utilizando la técnica de RT-PCR. No obstante, mediante Western blot se comprobó que la lesión incrementa significativamente los niveles

proteicos de GDNF en el caudado del hemisferio lesionado en relación al hemisferio contralateral. Mediante inmunohistoquímica, también se confirmaron los resultados del Western blot, permitiendo así distinguir una mayor inmunorreactividad para GDNF en el caudado ipsilateral respecto al contralateral a la lesión. La inmunorreactividad para GDNF en la sustancia negra, igual que en el caudado, también es mayor en el hemisferio ipsilateral a la lesión respecto al contralateral. De este modo, y de acuerdo con los resultados obtenidos, los cambios de expresión a nivel proteico no se correlacionan con variaciones en la expresión de ARNm. Es posible que los transcritos de GDNF estén siendo traducidos rápidamente a proteína, o bien, como ocurre con otros factores neurotróficos como BDNF, es posible que GDNF se esté sintetizando en otras áreas del cerebro para luego ser transportado de forma anterógrada al estriado (Rind y Von Bartheld, 2002; Russell y col., 2000) y frenar el avance de la lesión. De forma similar, GDNF sintetizado y/o concentrado en el estriado, puede ser conducido retrógradamente a través de las fibras nigroestriatales hacia los somas de las neuronas dopaminérgicas lesionadas para mantener la integridad celular y los circuitos dopaminérgicos del cerebro (Coulpier e Ibáñez, 2004). En este sentido existen trabajos que indican que el factor neurotrófico GDNF interacciona con su complejo receptor (GFR α -1/Ret) situado en la superficie de la membrana axonal, y desencadena cascadas de señalización locales que afectan a la región terminal del axón, o bien, cascadas de señalización distales, que se propagan de forma retrógrada hacia los somas celulares (Coulpier y col., 2004). Las primeras, serían activadas por las proteínas serina-treonina kinasas, ERK-1 y ERK-2 (implicadas en la regulación del crecimiento de la neurita) y Akt (crucial en la internalización y propagación de los complejos ligando-receptor, así como en el transporte retrógrado de los factores neurotróficos), mientras que las segundas, de propagación unidireccional y retrógrada, se desencadenarían por la activación de Akt y Ret (inducen la supervivencia neuronal en respuesta al ligando GDNF), pero no de ERK-1 y ERK-2. El grupo de ratas con lesiones simuladas no muestra cambios de expresión de ARNm y proteína de GDNF entre el hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión del caudado y sustancia negra, por tanto el procedimiento quirúrgico no interfiere en nuestros resultados.

En conclusión, la lesión inducida por la inyección de 6-OHDA incrementa los niveles proteicos de GDNF tanto en el caudado como en la sustancia negra. Posiblemente, GDNF libre o el que interaccione con sus complejos receptores situados en los terminales axonales de las neuronas dopaminérgicas que llegan al estriado, pueda ser endocitado y transportado retrógradamente hasta el soma de las neuronas afectadas por la lesión, o bien, desencadene

directamente cascadas de señales intracelulares y retrógradas en los mismos terminales axonales estriatales. En cualquier caso, la activación de los receptores por GDNF actuará desencadenando cascadas de señalización inductoras de la supervivencia neuronal.

Además de analizar la expresión de GDNF en el modelo animal hemiparkinsoniano, también estudiamos la expresión proteica de la enzima implicada en la biosíntesis de dopamina, Tirosina Hidroxilasa (TH), la cual actúa como marcador del grado de degeneración y mortalidad de la población neuronal dopaminérgica. De este modo, a las 3 semanas de haber inyectado 6-OHDA en el haz prosencefálico medial, se realizó la inmunohistoquímica para TH en el caudado y sustancia negra que permitió comprobar el grado de degeneración de las neuronas TH positivas. En ambas estructuras del cerebro se aprecia una considerable reducción de la expresión de TH en el hemisferio ipsilateral en relación al hemisferio contralateral a la lesión. No obstante, cuando comparamos la inmunohistoquímica para TH en los somas de la sustancia negra del hemisferio contralateral con la inmunorreactividad para TH en la sustancia negra del grupo con lesiones simuladas (caracterizado por inmunorreactividad idéntica en el caudado y sustancia negra de ambos hemisferios, y una morfología celular que representaría el estado normal celular), también se aprecia una leve disminución del número de células TH positivas, así como de la intensidad de inmunorreactividad para TH. Este hecho podría confirmar la existencia de proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales interhemisféricas, a través de las cuales la neurotoxina podría actuar lesionando los dos sistemas nigroestriatales del cerebro. Este asunto resulta bastante controvertido, ya que mientras algunos autores (Finkelstein y col., 2000; Berger y col., 1991) detectan degeneración neuronal dopaminérgica de la sustancia negra contralateral a la lesión en sus estudios, otros (Ichitani y col., 1994), utilizando el método del trazado retrógrado con la subunidad B de la toxina del cólera, no pudieron demostrar la existencia de esta comunicación nigroestriatal entre ambos hemisferios.

Los somas celulares de las neuronas dopaminérgicas se localizan en la parte compacta de la sustancia negra, mientras que sus prolongaciones dendríticas tanto permanecen en la parte compacta como se extienden a la parte reticular de la sustancia negra. Según ciertos estudios en los que se inyecta 6-OHDA en el estriado izquierdo de rata, cuando se compara la morfología celular de las células TH positivas en la sustancia negra del hemisferio lesionado, respecto a la de las células control, se detecta que a las 2 semanas de administrar 6-OHDA, las neuronas dopaminérgicas sufren cambios muy evidentes. Mientras las neuronas normales presentan una

forma redondeada característica de este tipo celular, las neuronas lesionadas adquieren múltiples formas irregulares, triangulares o en forma de luna, e incluso con distinto patrón de tonalidades (unas claras y otras oscuras). Además, muchas de estas células TH positivas con síntomas de degeneración se rompen y pierden parte del contenido citoplasmático, e incluso el núcleo. El área tegmental ventral también se ve afectado por estos cambios morfológicos, aunque de una forma menos aparente (Yuan y col., 2004). Efectivamente, según nuestros resultados las neuronas que sobreviven al efecto de la neurotoxina en la sustancia negra, muestran numerosos signos de degeneración si se comparan con la morfología celular de las neuronas del grupo con lesiones simuladas: alteración de la morfología normal del soma neuronal al adquirir formas irregulares generalmente más alargadas, e involución del árbol dendrítico. También se aprecia una tonalidad diferencial en la inmunorreactividad para TH, posiblemente debido al efecto inhibitorio de la neurotoxina sobre el metabolismo biosintético del neurotransmisor dopamina.

Paralelamente al estudio del efecto de la inyección de 6-OHDA en el modelo *in vivo*, también se analizó el efecto de la neurotoxina administrada a los cultivos neuronales de estriado, sobre la expresión de ARNm y proteína de GDNF, y la supervivencia celular. En primer lugar se analizó el efecto de las dosis 50 y 100 μ M de 6-OHDA tras varios tiempos de exposición (2-24 horas), sobre la expresión de ARNm de GDNF, mediante RT-PCR. Los resultados indican que la neurotoxina incrementa significativamente la expresión de ARNm de GDNF, siendo máxima a las 4 (dosis 100 μ M) y 6 horas (dosis 50 μ M) de ser administrada en relación a las células control. A partir de estas dosis máximas de expresión, los niveles de ARNm comienzan a disminuir. A continuación, para determinar la expresión proteica de GDNF bajo las mismas condiciones experimentales, se utilizó la técnica de Western blot, la cual demuestra que utilizando la dosis 50 μ M, la expresión es significativamente mayor en las neuronas expuestas ante 6-OHDA durante 6 y 8 horas, respecto a las neuronas control. Paralelamente al estudio de ARNm y proteína, las neuronas en cultivo tratadas con 6-OHDA también fueron sometidas al ensayo de supervivencia celular. Así, pudimos comprobar que a dosis y tiempos de exposición crecientes de 6-OHDA, la mortalidad neuronal es mayor.

Distintos trabajos realizados sobre cultivos mesencefálicos mixtos donde confluyen neuronas dopaminérgicas y células gliales para estudiar el efecto de GDNF como neuroprotector, demuestran que este factor neurotrófico no previene la muerte neuronal pero sí estimula el crecimiento de las células dañadas. La administración de la neurotoxina 6-OHDA a estos cultivos conduce muerte celular de todas las poblaciones existentes en el cultivo, tanto

específicamente a través de los transportadores de dopamina (neuronas dopaminérgicas), como inespecíficamente, mediante su autooxidación y generación de ROS (neuronas dopaminérgicas y glia) (Kramer y col., 1999). Por tanto es muy posible que la toxicidad ejercida por 6-OHDA *in vitro* sea diferente a lo que ocurre en el modelo animal de tal manera que GDNF puede ser incapaz de proteger a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración y muerte bajo estas condiciones. Según nuestros resultados, 6-OHDA también reduce la viabilidad celular en los cultivos neuronales de estriado, e induce como mecanismo de defensa en las células supervivientes, el incremento de la síntesis de GDNF, sobre todo cuando los tiempos de exposición son cortos.

2.2. Efecto de Vitamina D administrada i.p. antes de inyectar 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (Efecto Pre-lesión) sobre la expresión de GDNF y tirosina hidroxilasa.

Numerosos trabajos han demostrado el efecto protector de GDNF sobre el sistema nigroestriatal cuando se administra intraestriatalmente y coincide con el sitio de inyección de la neurotoxina. En este caso, GDNF, además de producir la reinervación estriatal, también protege y conserva los somas en la sustancia negra. Posiblemente este efecto se deba al bloqueo del transporte de 6-OHDA a través de los receptores dopaminérgicos o al aumento en la eficacia de detoxificación intracelular de 6-OHDA internalizada (Aoi y col., 2000; Kirik y col., 2000). Tal y como indican nuestros resultados y numerosos estudios, vitamina D activa la expresión de distintos factores neurotróficos, entre ellos, GDNF. Existen trabajos realizados en pacientes con la Enfermedad de Parkinson que vinculan o relacionan la vitamina D a este trastorno neurodegenerativo. A estos enfermos se les detectó una disminución de vitamina D en los niveles séricos (Sato y col., 1997), y al suplir este déficit mediante la administración exógena de la misma, los síntomas y signos parkinsonianos se atenuaron (Derex y Trouillas, 1997).

Hasta el momento poco se conoce sobre el efecto de vitamina D administrada i.p. y previamente a la inyección de 6-OHDA. Hay datos que indican que el pretratamiento i.p. durante 8 días con vitamina D en un modelo animal hemiparkinsoniano similar al nuestro, restaura el déficit motor que ocasiona la neurodegeneración dopaminérgica, así como los niveles de dopamina y sus metabolitos en la sustancia negra del hemisferio lesionado. El único estudio en el que se estudia el efecto neuroprotector de vitamina D al modular la expresión de GDNF, es el

recientemente descrito por Smith y colaboradores (Smith y col., 2006) en el que el pretratamiento i.p. con vitamina D en un modelo de lesión intracerebroventricular, incrementa los niveles de GDNF en la sustancia negra pero no en el estriado.

Teniendo esto en cuenta, el tercer objetivo fue comprobar si el incremento de la expresión de GDNF inducido tras la administración i.p. de vitamina D (descrito como primer objetivo) en nuestro modelo animal hemiparkinsoniano, podría ser suficiente para contrarrestar los efectos de la lesión. Para ello, sometimos a un grupo de ratas al tratamiento i.p. con vitamina D durante 7 días consecutivos. En el séptimo y último día de tratamiento con vitamina D, se inyecta estereotáxicamente en las fibras del haz prosencefálico medial que conectan la sustancia negra con el estriado del hemisferio izquierdo cerebral, la neurotoxina 6-OHDA, y a continuación, se dejan transcurrir 3 semanas. Se analizan y cuantifican los niveles de expresión de ARNm y proteína de GDNF en el estriado del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión mediante RT-PCR y Western blot. Nuestros resultados indican que no se producen cambios de expresión en los niveles de ARNm de GDNF entre ambos hemisferios. Sin embargo, los niveles proteicos del factor neurotrófico sí son significativamente mayores en el lado lesionado, respecto al lado no lesionado. Este incremento de inmunorreactividad para GDNF en el hemisferio ipsilateral respecto al contralateral a la lesión, también se visualiza inmunohistoquímicamente, tanto en el estriado como en la sustancia negra.

Igual que en el estudio del grupo de animales hemiparkinsonianos lesionados no sometidos al pretratamiento i.p. con vitamina D, en este segundo grupo de estudio, también se valoró la expresión de TH en la sustancia negra y estriado del hemisferio ipsilateral y contralateral a la lesión. La inmunorreactividad para TH en este grupo de animales hemiparkinsonianos tratados i.p. con vitamina D antes de lesionar, disminuyó tanto en el estriado como en sustancia negra del hemisferio ipsilateral a la lesión, sin embargo, no disminuye de una forma tan acusada como se apreciaba en el grupo anterior únicamente lesionado. Además de la reducción de la densidad neuronal dopaminérgica, también detectamos signos de degeneración apreciables en la morfología de los somas de la sustancia negra del hemisferio en el que se inyectó 6-OHDA, aunque menos intensos que en el grupo lesionado y no tratado con vitamina D.

Así pues, según los resultados obtenidos, es posible que la administración i.p. de vitamina D, al incrementar la expresión de GDNF, indirectamente esté realizando un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas, atenuando el grado de degeneración y reduciendo la mortalidad

celular. Para ello, vitamina D podría actuar activando, directa o indirectamente a través de otros factores de transcripción, la expresión de GDNF, aunque como se mencionó anteriormente, también es posible que el factor GDNF sea movilizado desde otras localizaciones del cerebro hacia las zonas afectadas por la lesión. En cualquier caso, y en última instancia, GDNF, a través de vitamina D, parece ejercer un papel protector o reductor del daño al mantener la integridad celular de la población neuronal dopaminérgica de los tejidos lesionados.

En la bibliografía se recogen estudios en los que se demuestra el efecto neuroprotector de la administración de vitamina D *in vitro*. En estos trabajos se utilizan cultivos primarios mesencefálicos integrados fundamentalmente por neuronas dopaminérgicas que se exponen ante distintos agentes neurotóxicos tales como glutamato, H₂O₂ o neurotoxinas dopaminérgicas (MPP⁺ y 6-OHDA). MPP⁺ y 6-OHDA generan una sobreproducción de ROS a través de la inhibición de la actividad del complejo I y autooxidación, respectivamente. El tratamiento con vitamina D durante 24 (Ibi y col., 2001) o 48 horas (Wang y col., 2001) antes de administrar 6-OHDA, reduce el grado de mortalidad neuronal inducido por la elevada concentración de ROS en el medio intracelular, posiblemente debido a un efecto neutralizador y neuroprotector de la vitamina D (Ibi y col., 2001).

Mientras la mayor parte de estudios se realizaron para conocer el efecto neuroprotector de vitamina D sobre las neuronas dopaminérgicas lesionadas, nada se sabe sobre lo que ocurre cuando las neuronas del estriado, sintetizadoras de GDNF en el sistema nigroestriatal y cuya expresión es incrementada por la administración de vitamina D, se exponen ante la neurotoxina 6-OHDA. En este sentido, existen trabajos que demuestran que los factores neurotróficos, fundamentalmente GDNF, protegen a todas las poblaciones neuronales del estriado del daño inducido por ácido kaínico (Gratacos y col., 2001). GDNF posiblemente ejerce su acción neuroprotectora a través de una serie de mecanismos: neutralización de los niveles elevados de Ca⁺² y/o incremento de expresión de proteínas de unión al calcio como las calbindinas, y activación de la expresión de proteínas pro-supervivencia (Sawada y col., 2000) o disminución de la actividad de las caspasas (Han y col., 2000). En este trabajo estudiamos el efecto del pretratamiento con vitamina D en cultivos primarios neuronales de estriado expuestos a 6-OHDA. En este caso, el tratamiento con vitamina D antes de añadir la neurotoxina, induce un incremento muy significativo de la expresión de ARNm de GDNF respecto a las neuronas no pretratadas pero sí expuestas ante 6-OHDA y/ o las neuronas control. El incremento de la expresión de ARNm de GDNF es mayor cuando el tiempo de exposición de las células ante la

neurotoxina es corto (a las 2 horas). Posiblemente, y de acuerdo a los resultados obtenidos *in vivo*, vitamina D induce resistencia celular frente a la acción neurotóxica de 6-OHDA, ya que estimula la síntesis del factor neurotrófico GDNF. Según el trabajo realizada por Kramer y colaboradores en 1999, a medida que transcurre el tiempo, 6-OHDA diluida en el medio de cultivo se autooxida generando cada vez más radicales libres responsables de la alteración y muerte celular indiscriminada. De este modo, es posible que la disminución de la expresión de GDNF a lo largo del tiempo de exposición ante 6-OHDA se deba a la previa disminución de la viabilidad de las neuronas en cultivo.

2.3. Efecto de Vitamina D administrada i.p. después de inyectar 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (Efecto Post-lesión) sobre la expresión de GDNF y tirosina hidroxilasa.

Además de realizarse trabajos que demostraron el efecto preventivo de GDNF, también se comprobó y demostró el efecto recuperativo de la administración de GDNF sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal lesionado con 6-OHDA. No obstante, parece que el factor neurotrófico es menos eficaz en reparar los daños ya establecidos que en prevenirlos (Aoi y col., 2000).

En este sentido, establecimos un cuarto y último grupo de estudio que permitió evaluar el efecto de la administración i.p. de vitamina D en nuestro modelo de rata hemiparkinsoniana ya establecido. De este modo, lesionamos los animales mediante la inyección de 6-OHDA en las fibras del haz prosencefálico medial del hemisferio izquierdo cerebral análogamente a los grupos restantes, y a partir del día 21, se comienza a administrar i.p. vitamina D diariamente durante 7 días. A continuación, se analizó la expresión de ARNm y proteína de GDNF mediante RT-PCR y Western blot, respectivamente, a partir del estriado. En este modelo tampoco se detecta un incremento significativo de la expresión del transcrito de GDNF en el estriado del hemisferio ipsilateral a la lesión, respecto al contralateral. Sin embargo, nuevamente los niveles proteicos del factor neurotrófico fueron significativamente mayores en el estriado del hemisferio lesionado, en relación al hemisferio no lesionado. El estudio inmunohistoquímico también detectó una mayor inmunorreactividad para GDNF en la sustancia negra y estriado del hemisferio lesionado, respecto al sistema nigroestriatal del hemisferio contralateral a la lesión.

En cuanto a la inmunopositividad para TH, tanto en la sustancia negra como en el estriado, se aprecia una clara disminución del número de células dopaminérgicas y de sus proyecciones axonales en el hemisferio lesionado con 6-OHDA, respecto al lado contralateral no lesionado. Esta reducción de la densidad celular se acompaña con la degeneración de los somas de las neuronas supervivientes de la sustancia negra, de forma similar a como ocurría en el grupo de animales sólo lesionados.

La vitamina D incrementa la expresión de GDNF independientemente del momento en que se administre (antes o después de inducir la lesión). Sin embargo, mientras los niveles de expresión de GDNF son suficientes para actuar protegiendo y/o atenuando la degeneración de las neuronas inmunorreactivas para TH, haciendo a las células posiblemente más resistentes al efecto de la neurotoxina 6-OHDA cuando ésta se administra después del pretratamiento con vitamina D, por el contrario, son insuficientes para ejercer un efecto reparador de las neuronas previamente lesionadas.

2.4. Efecto de Vitamina D sobre la morfología neuronal dopaminérgica.

Una de las acciones no clásicas de vitamina D es la de modular el desarrollo, crecimiento y diferenciación celular (Brown y col. 1999). Existen evidencias que indican que vitamina D ejerce este efecto a través de su capacidad para modular la expresión de citoquinas y factores de crecimiento, y de sus receptores (Gurlek y col., 2002).

Además del efecto protector de vitamina D sobre la población neuronal dopaminérgica en el modelo animal hemiparkinsoniano descrito en este estudio, también pudimos comprobar el efecto de la vitamina *in vivo*, en el tejido nigral normal no lesionado. Al observar la morfología de las células inmunorreactivas para TH en la sustancia negra del hemisferio no lesionado de los dos últimos grupos de estudio descritos en los que se administraba vitamina D antes y/o después de lesionar con 6-OHDA, se aprecia un mayor desarrollo neuronal, que afecta fundamentalmente al crecimiento y expansión del árbol dendrítico. Esta diferenciación celular es incluso mayor que la que presentan los cuerpos celulares de la sustancia negra del grupo con lesiones simuladas (caracterizado por integrar neuronas dopaminérgicas con una morfología y grado de desarrollo normal).

Así pues, una vez más se puede concluir que la vitamina D regula positivamente la expresión de GDNF en la sustancia negra y el estriado, y éste, posiblemente junto a otros factores de crecimiento, modula el estado de diferenciación celular.

7. CONCLUSIONES

1. La Vitamina D administrada sistémicamente incrementa la expresión del gen de GDNF en el estriado de ratas adultas.
2. La inyección estereotáxica unilateral de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial de rata induce la degeneración selectiva de la población neuronal dopaminérgica de la sustancia negra del hemisferio lesionado, la cual provoca cambios en el comportamiento motor, e incrementa la expresión de GDNF.
3. La administración de Vitamina D previa a la lesión con 6-OHDA incrementa la expresión de GDNF y reduce el daño en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.
4. La administración de Vitamina D posterior a la lesión con 6-OHDA incrementa la expresión de GDNF pero no reduce el daño neuronal causado por la neurotoxina.
5. La administración de 6-OHDA a los cultivos primarios de neuronas de estriado de rata induce muerte neuronal e incrementa la expresión de GDNF.
6. La administración de Vitamina D a los cultivos primarios de neuronas de estriado de rata incrementa la expresión de GDNF.
7. El tratamiento con Vitamina D previo a la administración de 6-OHDA en cultivos primarios de neuronas de estriado de rata potencia la expresión de GDNF con respecto a los cultivos no tratados con vitamina D.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abe K. and Hayashi T. (1997) Expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor gene in the rat brain after transient MCA occlusion. Brain Res. **776**: 230-34
- Agid Y., Javoy-Agid F. and Ruberg M. (1987) Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. Mov. Disor. **2**: 166-230
- Airaksinen M.S., Titievsky A. and Saarna M. (1999) GDNF family neurotrophic factor signalling; Four masters, one servant?. Mol. Cell Neurosci. **13**: 313-25
- Akaoka H., Charlety P., Saunier C.F., Buda M., Chouvet G. (1992) Inhibition of nigral dopamine neurons by systemic and local apomorphine: Possible contribution of dendritic autoreceptors. Neuroscience **49**: 879-91
- Akerud P., Alberch J., Eketjall S., Wagner J., Arenas E. (1999) Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. J. Neurochem. **73**: 70-8
- Akerud P., Canals J.M., Snyder E.Y. and Arenas E. (2001) Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. J. Neurosci. **21**: 81108-18
- Alexander G.E. and Crutcher M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. Trends Neurosci. **13**: 266-71
- Altar C.A., Distefano P.S. (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. Trends Neurosci. **21**: 433-37
- Aoi M., Date I., Tomita S., Ohmoto T. (2000) GDNF induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. Acta Neurochir. (Wien.) **142**: 805-10
- Aoi M., Date I., Tomita S., Ohmoto T. (2001) Single administration of GDNF into the striatum induced protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system in the intrastriatal 6-hydroxydopamine injection model of hemiparkinsonism. Restor. Neurol. Neurosci. **17**: 31-8
- Ariano M.A. (1989) Long-term changes in striatal D1 dopamine receptor distribution after dopaminergic deafferentation. Neuroscience. **32**: 203-12.
- Aronin N., DiFiglia M., Graveland G.A., Schwartz W.J. and Wu J.Y. (1984). Localization of immunoreactive enkephalins in GABA synthesizing neurons of the rat neostriatum. Brain Res. **300**: 376-380
- Baas D., Prufer K., Ittel M.E., Kuchler-Bopp S., Labourdette G., Sarlieve L.L. and Brachet P. (2000) Rat oligodendrocytes express the vitamin D₃ receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Glia **31**: 59-68

- Baker A.R., McDonnell D.P., Hughes M., Crisp T.M., Mangelsdorf D.J., Haussler M.R., Pike J.W., Shine J. and O'Malley B.W. (1988) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. **85**: 3294-8
- Baloh R.H., Enomoto H., Johnson E.M.J. and Milbrandt J. (2000) The GDNF family ligands and receptors-implications for neural development. Curr. Opin. Neurobiol. **10**: 103-110
- Bevan C. and Parker M. (1999) The role of coactivators in steroid hormone action. Exp. Cell Res. **523**: 349-56
- Björklund A., Rosenblad C., Winkler C. and Kirik D. (1997) Studies on Neuroprotective and Regenerative effects on GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. **4**: 186-200
- Blesch A., Grill R.J. and Tuszynski M.H. Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration in: F.W. Van Leeuwen, Salchi A., Giger R.J., Holtmaat A.J.G.D. and Verhaagen J. (Eds). Progress in Brain Research, vol. 117, Elsevier Science BV. 1998. pp. 473-84
- Blomer U., Naldini L., Kafri T., Trono D., Verma I.M. and Gage F.H. (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. J. Virol. **9**: 6641-49
- Bolam J.P., Wainer B.H. and Smith A.D. (1984) Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum: A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. Neuroscience **12**: 711-722
- Bocquel M.T., Kumar V., Stricker C., Chambon P. and Gronemeyer H. (1989) The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. Nucleic. Acid Res. **17**: 2581-95
- Bouthenet M.L., Souil E., Martres M.P., Sokoloff P., Giros B. and Schwartz J.C. (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. Brain Res. **564**: 203-19
- Bowers W.J., Howard D.F. and Federoff H.J. (1997) Gene therapeutic strategies for neuroprotection: Implications for Parkinson's disease. Exp. Neurol. **144**: 58-68
- Brachet P., Neveu I., Naveilhan P., Garcion E. and Wion D. Vitamin D, a Neuroactive Hormone: From Brain Development to Pathological Disorders in: Feldman D., Pike J.W. and Glorieux F.H. and (Eds). Vitamin D, Elsevier Inc. 2005. pp. 1779-89
- Brown A.J. (1998) Vitamin D analogues. Am J. Kid. Dis. Suppl. **32**: S25-38

- Brown A.J., Dusso A. and Slatopolsky E. (1999) Vitamin D. Am. J. Physiol. Renal Physiol. **277**: F157-F175
- Brown J., Bianco J.I., McGrath J.J. and Eyles D.W. (2003) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth, and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. Neurosci. Lett. **343**: 139-43
- Castañeda E., Wishaw I.Q. and Robinson T.E. (1990) Changes in striatal dopamine neurotransmission assessed with microdialysis following recovery from a bilateral 6-OHDA lesion: Variation as a function of lesion size. J. Neurosci. **10**: 1847-1854
- Chang H.T. Wilson C.J. and Kitai S.T. (1981) Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: A light and electron microscopic study. Science **213**: 915-918
- Chen H., Lin R.J., Xie W., Wilpitz D. and Evans R.M. (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. Cell **98**: 675-86
- Chesselet M.F. and Delfs J.M. (1996) Basal ganglia and movement disorders: An update. Trends Neurosci. **19**: 417-22
- Cheskis B. and Freedman L.P. (1994) Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D₃ receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. Mol. Cell Biol. **14**: 3329-38
- Chiba N., Suldan Z., Freedman L.P. and Parvin J.D. (2000) Binding of liganded vitamin D receptor to the vitamin D receptor interacting protein coactivator complex induces interaction with RNA polymerase II holoenzyme. J. Biol. Chem. **275**: 10719-22
- Cho J., Kholodilov N.G. and Burke R.E. (2003) The developmental time course of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and GDNF receptor α -1 mRNA expression in the striatum and substantia nigra. Ann. N.Y. Acad. Sci. **991**: 284-87
- Choi-Lundberg D.L. and Bohn M.C. (1995) Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. Dev. Brain Res. **85**: 80-88
- Choi-Lundberg D.L., Lin Q., Chang Y.N., Chiang Y.L., Hay C.L., Mohajeri H., Davidson B.L. and Bohn M.C. (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. Science **275**: 838-841
- Choi-Lundberg D.L., Lin Q., Schallert T., Crippens D., Davidson B.L., Chang Y-N., Chiang Y.L., Qian J., Barfwaj L. and Bohn M.C. (1998) Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by an adenoviral encoding glial cell line-derived neurotrophic factor. Exp. Neurol. **154**: 261-75
- Ciliax B.J., Nash N., Heilman C., Sunahara R., Hartney A., Tiberi M., Rye D.B., Caron M.G., Niznik H.B. and Levey A.I. (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. Synapse. **37**: 125-45

- Connor B. (2001) Adenoviral vector-mediated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor provides neuroprotection in the aged parkinsonian rat. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **28**: 896-900
- Connor B., Beilharz E.J., Williams C., Gluckman P.D., Faull R.L.M. and Dragunow M. (1997) Insuline-like growth factor (IGF-1) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. Mol. Brain Res. **49**: 283-90
- Connor B. and Dragunow M. (1998) The role of neuronal growth factor in neurodegenerative disorders of the human brain. Brain Res. Brain Res Rev. **27**: 1-39
- Cornet A., Baudet C., Neveu I., Baron-Van Evercooren A., Brachet P. and Naveilhan P. (1998) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the expression of VDR and NFG gene in Schwann cells *in vitro*. J. Neurosci. Res. **53**: 742-46.
- Costa S., Irvani M.M., Pearce R. K. and Jenner P. (2001) Glial cell line derived neurotrophic factor concentration dependently improves disability and motor activity in MPTP-treated common marmosets. Eur J. Pharmacol. **412**: 45-50
- Cowan R.L., Wilson C.J., Emson P. and Heizman C.W. (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. J. Comp. Neurol. **302**: 197-205
- Creese I., Burt D.R. and Snyder S.H. (1977). Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioural supersensitivity. Science **197**: 596-598
- Cunningham L.A. and Su C. (2002) Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's disease. Exp. Neurol. **174**: 230-42
- Date I., Shingo T., Yoshida H., Fujiwara K., Kobayashi K., Takeuchi A. and Ohmoto T. (2001) Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats. Cell Transplant. **10**: 397-401
- Davies A.M. (2003) Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. The EMBO J. **22**: 2537-45
- DeLuca H.F., Krisinger J. and Darwish H. (1990) The vitamin D system: 1990. Kidney Int. Suppl. **29**: S2-8
- Dereix I. and Trouillas P. (1997) Reversible parkinsonism, hypophosphoremia, and hypocalcemia under vitamin D therapy. Mov. Disorder. **12**: 612-13
- Dietz G.P.H., Valbuena P.C., Dietz B., Meuer K., Müller P., Weishaupt J.H. and Bähr M. (2006) Application of a blood-brain-barrier-penetrating form of GDNF in a mouse model for Parkinson's disease. Brain Res. **1082**: 61-6
- DiFiglia M. and Aronin M. (1982) Ultrastructure of Golgi-impregnated and gold-toned spiny and aspiny neurons in the monkey neostriatum. J. Neurocytol. **9**: 471-492

- Dressel Y., Thormeyer D., Altincicek B., Paululat A., Eggert M., Schneider S., Tenbaum S.P., Renkawitz R. and Baniahmad A. (1999) Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. Mol Cell Biol. **19**: 3383-94
- Ebadi M., Bashir R.M., Heidrick M.L., Hamada F.M., Rafaey H.E., Hamed A., Helal G., Baxi M.D., Cerutis D.R. and Lassim N.K. (1997) Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. Neurochem. Int. **30**: 347-74
- Eketjäll S., Fainzilber M., Murray-Rust J. and Ibáñez C.F. (1999) Distinct structural elements is GDNF mediate binding to GFR α 1 and activation of the GFR α 1-cRet receptor complex. EMBO J. **18**: 5901-10
- Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science **240**: 889-95.
- Eyles D., Brown J., Mackay-Sim A., McGrath J. and Feron F. (2003) Vitamin D₃ and brain development. Neuroscience **118**: 641-53
- Fallon J.H. and Leslie, F.M. (1986). Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. J. Comp. Neurol. **249**: 293-336
- Fondell J.D., Ge H. and Roeder R.G. (1996) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 8329-33
- Garcion E., Nataf S., Berod A., Darcy F. and Brachet P. (1997) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. Brain Res. Mol. Brain Res. **45**: 255-67
- Garcion E., Sindji L., Montero-Menei C., Andre C., Brachet P. and Darcy F. (1998) Expresión of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: Regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Glia **22**: 282-94
- Garcion E., Thanh X.D., Bled F. Teissier E., Dehouck M.P., Rigault F., Brachet P., Girault A., Torpier G. and Darcy F. (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates gamma I transpeptidase activity in rat brain. Neurosci. Lett. **216**: 183-86
- Gash D.M., Zhang Z., Ovadia A., Cass W.A., Yi A., Simmerman L., Russell D., Martin D., Lapchak P.A., Collins F., Hoffer B.J. and Gerhardt G.A. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. Nature **380**: 252-55
- Gerfen C.R., Keefe K.A. and Gauda E.B. (1995) D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: Coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. J. Neurosci. **15**: 8167-76

- Gerhardt G.A., Cass W.A., Huetl P., Brock S., Zhang Z., Gash D.M. (1999) GDNF improves dopamine function in the substantia nigra but not the putamen of unilateral MPTP-lesioned rhesus monkeys. Brain Res. 817: 163-71
- Germain P., Altucci L., Bourguet W., Rochette-Egly C. and Gronemeyer H. (2003) Nuclear receptor superfamily: Principles and signaling. Pure Appl. Chem. 75: 1619-64
- Giasson B.I., Ischiropoulos H., Lee V.M., and Trojanowski J.Q. (2002) The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Free Radic. Biol. Med. 32: 1264-75
- Glass C.K. and Rosenfeld M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. Genes and Development 14: 121-41
- Gouhier C., Chalon S., Aubert-Pouessel A., Vnier-Julienne M.C., Jollivet C., Benoit J.P. and Guilloteau D. (2002) Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivery by micropheres in a rodent model of Parkinson's disease. Synapse 44: 124-31
- Gratacos E., Perez-Navarro E., Tolosa E., Arenas E. and Alberch J. (2001) Neuroprotection of striatal kainate excitotoxicity by neurotrophins and GDNF family members. J. Neurochem. 78: 1287-96
- Grondin R., Zhang Z., Yi A., Cass W.A., Maswood N., Andersen A.H., Elsberry D.D., Klein M.C., Gerhardt G.A. and Gash D.M. (2002) Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. Brain 125: 2191-201
- Gurlek A., Pittelkow M.R. and Kumar R. (2002) Modulation of growth Factor/Cytokine synthesis and signaling by 1α -Dihydroxyvitamin D₃; Implications in cell growth and differentiation. Endocrine Rev. 23: 763-86
- Hager G.L., Lim C.S. and Baumann C.T. (2000) Trafficking of nuclear receptors in living cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74: 249-54
- Halliwell B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. Drugs Aging 18: 685-716
- Hammarberg H., Piehl F., Cullheim S., Fjell J., Hokfelt T. and Fried K. (1996) GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. Neuroreport 7: 857-60
- Han B.H., D'Costa A., Back S.A., Parsadanian M., Patel S., Shah A.R., Gidday J.M., Srinivasan A., Deshmukh M. and Holtzman D.M. (2000) BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. Neurobiol. Dis. 7: 38-53
- Havas K., Flans A., Phelan M.L., Kingston R.E., Wade P.A., Lilley D.M.J. and Owen-Hughes T. (2000) Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodelling activities. Cell 103: 1133-42

- Hefti F., Melamed E., Sahakian B.J. and Wurtman R.J. (1980 a) Circling behaviour in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: Effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. Pharmacol. Biochem. Behav. **12**: 185-188
- Hefti F., Melamed E. and Wurtman R.J. (1980 b) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in the rat brain: Biochemical characterization. Brain Res. **195**: 123-137
- Heikkila R. and Cohen G. (1972) Further studies on the generation of hydrogenperoxide by 6-hydroxydopamine. Mol. Pharmacol. **8**: 241-248
- Henderson C.E., Phillips H.S., Pollock R.A., Davies A.M., Lemeulle C., Armanini M., Simmons L., Moffet B., Vandlen R.A. and Simpson L.C. (1994) GDNF: A potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. Science. **266**: 1062-4. Erratum in: Science **267**: 777
- Ho A., Gore A.C., Weickert C.S. and Blum M. (1995) Glutamate regulation of GDNF gene expression in the striatum and primary striatal astrocytes. Neuroreport **6**: 1454-58
- Hou J.G., Cohen G. and Mytilineou C. (1997) Basic fibroblastic growth factor stimulation of glial cell protects dopamine neurons from 6-hydroxydopamine toxicity: Involvement of glutathione system. J. Neurochem. **69**: 76-83
- Hu X. and Lazar M.A. (2000) Transcriptional repression of nuclear hormone receptor. Trends Endocrinol. Metab. **11**: 6-10
- Hughes M.R., Malloy P.J., Kieback D.G., Kesterson R.A. Pike J.W., Feldman D. and O'Malley B.W. (1988) Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. Science **242**: 1702-5
- Humpel C., Hoffer B., Strömberg I., Bektesh S., Collins F. and Olson L. (1994) Neurons of hippocampal formation express glial cell line-derived neurotrophic factor messenger RNA in response to kainate-induced excitation. Neuroscience **59**: 791-95
- Hurelbrink C.B., Baker R.A. (2001) Prospects for the treatment of Parkinson's disease using neurotrophic factors. Expert Opin. Pharmacother. **2**: 1531-43
- Ibi M., Sawada H., Nakanishi M., Kume T., Katsuki H., Kaneko S., Shimohama S. and Akaike A. (2001) Protective effects of $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. Neuropharmacology **40**: 761-771
- Ichitani Y., Okamura H., Nakahara D., Nagatsu I. and Ibata Y. (1994) Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-Hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: Evidence for cell death in the substantia nigra. Exp. Neurol., **130**: 269-78

- Inden M., Kitamura Y., Kondo J., Hayashi K., Yanagida T., Takata K., Tsuchiya D., Yanagisawa D., Nishimura K., Taniguchi T., Shimohama S., Sugimoto H. and Akaike A. (2005) Seofendic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced nigral neurodegeneration and drug-induced rotational asymmetry in hemi-parkinsonian rats. J. Neurochem. **95**: 950-61
- Iravani M.M., Costa S., Jackson M.J., Tel B.C., Cannizzaro C., Pearce R.K. and Jenner P. (2001) GDNF reverses priming for dyskinesia in MPTP-treated, L-DOPA-primed common marmosets. Eur. J. Neurosci. **13**: 597-608
- Jellinger K. (1987). The pathology of parkinsonism. In Movement Disorders 2 (C.D. Marsden and S. Fahn, Eds), pp: 124-165. Butterworths, London
- Jellinger K. (1990). New developments in the in the pathology of Parkinson's disease. Adv. Neurol. **53**: 1-16
- Kaal E.C., Joosten E.A. and Bar P.R. (1997) Prevention and apoptotic motoneuron death in vitro by neurotrophins and muscle extract. Neurochem. Int. **31**: 193-201
- Kamimura S., Gallieni M., Zhong M., Beron W., Slatopolsky E. and Dusso A. (1995) Microtubules mediate cellular 25-hydroxyvitamin D₃ trafficking and the genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in normal human monocytes. J. Biol. Chem. **270**: 22160-6
- Kao H.Y., Downes M., Ordentlich P. and Evans R.M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. Genes Dev. **14**: 55-66
- Kawaguchi Y. (1993) Physiological morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. J. Neurosci. **13**: 4908-4923
- Kilic Ü., Kilic E., Dietz G.P.H. and Bähr M. (2003) Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. Stroke **34**: 1304-10
- Kilic Ü., Kilic E., Dietz G.P.H. and Bähr M. (2004) The TAT protein transduction domain enhances the neuroprotective effect of GDNF after optic nerve transection. Neurodegener. Dis. **1**: 44-9
- Kimura H., McGeer P.L., Peng J.H. and McGeer E.G. (1981) The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. J. Comp. Neurol. **200**: 151-201
- Kirik D., Rosenbland C., Björklund A. (2000) Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the rat 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. Eur. J. Neurosci. **12**: 3871-82
- Kita H. and Kitai S.T. (1989) Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: Their morphological types and populations. Brain Res. **447**: 346-52

- Kita H. and Kitai S.T. (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: A light and electron microscopic study. Brain Res. **536**: 1-15
- Kordower J.H. (2003) In vivo gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor for Parkinson's disease. Ann. Neurol. **53**: S120-S134
- Kramer B.C., Goldman A.D. and Mytineou C. (1999) Glial cell line derived neurotrophic factor promotes the recovery of dopamine neurons damaged by 6-hydroxydopamine in vitro. Brain Res. **851**: 221-27
- Kubota Y. and Kawaguchi Y. (1993) Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. J. Comp. Neurol. **332**: 499-513
- LaHoste G.J., Henry B.L. and Marshall J.F. (2000) Dopamine D1 receptors synergize with D2, but not D3 or D4, receptors in the striatum without the involvement of action potentials. J. Neurosci. **20**: 6666-71
- LaHoste G.J. and Marshall J.F. (1992) Dopamine supersensitivity and D1/D2 synergism are unrelated to changes in striatal receptor density. Synapse. **12**: 14-26.
- Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W. and Irwin I. (1983) Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. Science **219**: 979-980
- Laurikainen A., Hiltunen J.O., Thomas-Crusells J., Vanhatalo S., Arumae U., Airaksinen M.S., Klinge E. and Saarma M. (2000) Neurturin is a neurotrophic factor for penile parasympathetic neurons in adult rat. J. Neurobiol. **43**: 198-205
- Leitner M.L., Molliver D.C., Osborne P.A., Vejsada R., Golden J.P., Lampe P.A., Kato A.C., Milbrandt J. and Johnson E.M. (1999) Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), Neurturin, and Persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFR alpha coreceptor-specific. J. Neurosci. **19**: 9322-31
- Leo C. and Chen J.D. (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. Gene **245**: 1-11
- Li L., Wu W., Lin L.F., Lei M., Oppenheim R.W. and Houenou L.J. (1995) Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. Proc Natl Acad Sci. U S A. **92**: 9771-5
- Li Q. and Wrange O. (1995) Accessibility of a glucocorticoid response element dependent on its rotational positioning. Mol. Cell Biol. **15**: 4375-84
- Liang Y.O., Wightman R.M., Plotsky P. and Adams R.N. (1975) Oxidative interaction of 6-hydroxydopamine with CNS constituents. In: Jonsson G., Malmfors T., Sachs Ch., (Eds.) Chemical Tools in Catecholamine Research, pp: 15-22. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.

- Liberatore G.T., Wong J.Y.F., Porritt M.J., Donnan G.A. and Howells D.W. (1997) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA following mechanical injury to mouse striatum. Neuroreport **8**: 3097-101
- Limousin P., Krack P., Pollack P., Benazzouz A., Ardouin C., Hoffmann D. and Benabid A.L. (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. **339**: 1105-1111
- Lin L-F.H., Doherty D.H., Lile J.D., Bektesh S. and Collins F. (1993) GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science **260**: 1130-32
- Lin L-F.H., Zhang T.J., Collins F. and Armes L.G. (1994) Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor. J Neurochem **63**: 758-68
- Lindahl M., Timmusk T., Rossi J., Saarma M. and Airaksinen M.S. (2000) Expression and alternative splicing of mouse Gfra4 suggest roles in endocrine cell development. Mol.Cell Neurosci **15**: 522-33
- Lindner M.D., Winn S.R., Baetge E.E., Hammang J.P., Gentile F.T., Doherty E., McDermott P.E., Frydel B., Ullman M.D. and Schallert T. (1995) Implantation of encapsulated catecholamine and GDNF-producing cells in rats with unilateral dopamine depletions and parkinsonian symptoms. Exp. Neurol. **132**: 62-76
- López-Martín E., Carucho H., Rodríguez J., Guerra M.J. and Labandeira-García J.L. (1999) Striatal dopaminergic afferents concentrate in GDNF-positive patches during development and in developing intrastriatal striatal grafts. J. Comp. Neurol. **406**: 199-206
- McDonnell D.P., Mangelsdorf D.J., Pike J.W., Haussler M.R. and O'Malley B.W.(1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. Science **235**: 1214-7.
- Meador-Woodruff J.H., Mansour A., Grandy D.K., Damask S.P., Civelli O. and Watson S.J.Jr. (1992) Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. Neurosci Lett. **145**: 209-12
- Mengod G., Martínez-Mir M.I., Vilaro M.T. and Palacios J.M. (1989) Localization of the mRNA for the dopamine D2 receptor in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. Proc Natl Acad Sci U S A. **86**: 8560-4.
- Morel G., Cavalier A., G. Caballero T. y Gallego R. Hibridación *in situ* en microscopía óptica. Ed. Servicio de Publicaciones U.S.C. 2000
- Mufson E.J., Kroin J.S., Sendera T.J. and Sobreviela T. (1999) Distribution and retrograde of trophic factors in the central nervous system: Functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. Prog. Neurobiol. **57**: 451-84

- Mugnaini E. and Oertel W.H. (1985) An atlas of the distribution for GABAergic neurons and terminal in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In handbook of Chemical Neuroanatomy: GABA and Neuropeptides en the CNS. Vol. 4 (eds. Björhlund A. and Hökfelt T.) pp, 436-622. Elsevier. Amsterdam.
- Musiol I.M. and Feldman D. (1997) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induction of nerve growth factor in L929 mouse fibroblasts: Effect of vitamin D receptor regulation and potency of vitamin D3 analogs. Endocrinology **138**: 12-8
- Näär A.M., Lemon B.D. and Tjian R. (2001) Transcriptional coactivator complexes. Annu. Rev. Biochem. **70**: 475-501
- Nakao N., Yokote H., Nakai K. and Itakura T. (2000) Promotion of survival and regeneration of nigral dopamine neurons in a rat model of Parkinson's disease after implantation of embryonal carcinoma-derived neurons genetically engineered to produce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. J. Neurosurg. **92**: 659-70
- Naveilhan P., Neveu I., Wion D. and Brachet P. (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. Neuroreport **7**: 2171-5
- Neve K.A., Kozlowski M.R. and Marshall J.F. (1982) Plasticity of neostriatal dopamine receptors after nigrostriatal injury: Relationship to recovery of sensorimotor functions and behavioural supersensitivity. Brain Res. **244**: 33-44
- Neveu I., Naveilhan P., Jehan F., Baudet C., Wion D., De Luca H.F. and Brachet P. (1994a) 1,25-dihydroxvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. Mol. Brain Res. **24**: 70-76
- Norman A.W., Nemere Y., Zhou LX., Bishop J.E., Lowe K.E., Maiyar A.C., Collins E.D., Taoka T., Sergeev I. and Farach-Carson M.C. (1992) 1,25(OH)₂-vitamin D₃, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **41**: 231-40
- Nosrat C.A., Tomac A., Lindqvist E., Lindskog S., Humpel C., Stromberg I., Ebendal T., Hoffer B.J. and Olson J. (1996) Cellular expression of GDNF mRNA suggest multiple functions inside and outside the nervous system. Cell Tissue Res. **286**: 191-07
- Opacka-Juffry J., Ashworth S., Hume S.P., Martin D., Brooks D.J., Blunt S.B. (1995) GDNF protects against 6-OHDA nigrostriatal lesion: In vivo study with microdialysis and PET. Neuroreport **7**: 348-52
- Olanow C.W., Kordower J.H. and Freeman T.B. (1996) Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. Trends Neurosci **19**: 102-109
- Oppenheim R.W., Houenou L.J., Johnson J.E., Lin F.H., Li L., Lo A.C., Newsome A.L., Prevette D.M. and Wang S. (1995) Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. Nature **373**: 344-346

- Palfi S., Leventhal L., Chu Y., Ma S.Y., Emborg M., Bakay R., Deglon N., Hantraye P., Aebischer P. and Kordower J.H. (2002) Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J. Neurosci.* **22**: 4942-54
- Paratcha G., Ledda F., Baars L., Couplier M., Veste V., Anders J., Scout R., Ibáñez C.F. (2001) Released GFR α 1 potentiates downstream signalling, neuronal survival and differentiation via novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* **29**: 171-84
- Paratcha G., Ledda F., and Ibáñez C.F. (2003) The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* **113**: 867-79
- Park K.W., Eglitis M.A. and Mouradian M.M. (2001) Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. *Neurosci. Res.* **40**: 315-23
- Paxinos G. and Watson C. (1982) The Rat Brain in stereotaxic coordinates. Ed. New York: Academic Press.
- Penney J.B. and Young A.B. (1986). Striatal inhomogeneities and basal ganglia function. *Movement Disorders*, **1**: 3-15
- Peters G.A. and Khan S.A. (1999) Estrogen receptor domains E and F: Role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol.* **13**: 286-96
- Pezeshki, G., Franke B. and Engele J. (2001) Evidence for a ligand-specific signalling through GFR α -1, but not GFR α -2, in the absence of Ret. *J. Neurosci. Res.* **66**: 390-95
- Phelps P.E., Houser C.R. and Vaughn J.E. (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapsis. *J. Comp. Neurol.* **238**: 286-307
- Phelps P.E. and Vaughn J.E. (1986). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat neutral striatum a light and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* **15**: 595-617
- Polchon N.A.-M., Menoud A., Tseng J.L., Zurn A.D. and Aebischer P. (1997) Neuronal GDNF expression in the adult rat nervous system identified by in situ hybridization. *Eur. J. Neurosci.* **9**: 463-71
- Popsueva A., Poteryaev D., Arigui E., Meng X.J., Angers-Loustau A., Kaplan D., Saarma M. and Sariola H. (2003) GDNF promotes tubulogenesis of GFR alpha 1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. *J. Cell Biol.* **161**: 119-29
- Poteryaev D., Titievsky A.D., Sun Y.F., Thomas-Crusells J., Lindhal M., Arumäe U. and Saarma M. (1999) GDNF triggers a novel Ret-independent Src-kinase family-coupled signalling via a GPI-linked GDNF receptor α 1. *FEBS Lett.* **463**: 63-66

- Prüfer K., Veenstra T.D., Jirikowski G.F. and Kumar R. (1999) Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. J.Chem. Neuroanat. **16**: 135-145
- Rachez C. and Freedman L.P. (2000) Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: A network of coactivator interactions. Gene **246**: 9-21
- Rachez C., Suldan Z., Ward J., Chang C.P., Burakov D., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Freedman L.P. (1998) A novel protein complex that interacts with the vitamin D₃ receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. Genes Dev. **12**: 1787-800
- Rind H.B., Von Bartheld C.S. (2002) Anterograde axonal transport of internalized GDNF in sensory and motor neurons. Neuroreport **83**: 151-59
- Robinson T.E., Mocsary Z., Camp D.M. and Whishaw I.Q. (1994 a) Time course of recovery of extracellular dopamine following partial damage to the nigrostriatal dopamine system. J. Neurosci. **14**: 2687-2696
- Robinson T.E., Noordhoorn M., Chan E.M., Mocsary Z., Camp D.M. and Whishaw I.Q. (1994 b) Relationship between asymmetries in striatal dopamine release and the direction of amphetamine-induced rotation during the first week following unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra. Synapse **17**: 16-25
- Rosenbland C., Kirik D. and Björklund A. (2000) Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. Exp. Neurol. **161**: 503-15
- Rosenfeld M.G. and Glass C.K. (2001) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. J. Biol. Chem. **276**: 36865-68
- Russell F.D., Koishi K., Jiang Y. and McLennan (2000) Anterograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors in rat hypoglossal nerve. Neuroscience **97**: 575-80
- Saporito M.S., Brown E.R., Hartpence K.C., Wilcox H.M., Vaught J.L. and Carswell S. (1994) Chronic 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated induction of nerve growth factor mRNA and protein in L929 fibroblasts and in adult rat brain. Brain Res. **633**: 189-196
- Sato Y. Kikuyam M. and Oizumi K. (1997) High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in Parkinson's disease. Neurology **49**: 1273-78
- Sawada H., Ibi M., Kihara T., Urushitani M., Nakanishi M., Akaike A. and Shimohama S. (2000) Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons. J. Neurochem. **74**: 1175-84
- Schaar D.G., Sieber B.A., Dreyfus C.F. and Black I.B. (1993) Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. Exp. Neurol. **124**: 368-371

- Schmidt-Kastner R., Tomac A., Hoffer B., Bektesh S., Rosenzweig B. and Olson L. (1994) Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA upregulation in striatum and cortical areas after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. Mol. Brain Res. **26**: 325-30
- Seoane S. and Perez-Fernandez R. (2006) The vitamin D receptor represses transcription of the pituitary transcription factor Pit-1 gene without involvement of the retinoid X receptor. Mol. Endocrinol. **20**: 735-48
- Shafer R.A. and Levant B. (1998) The D3 dopamine receptor in cellular and organismal function. Psychopharmacology (Berl). **135**: 1-16.
- Shingo T., Date I., Yoshida H., Ohmoto T. (2002) Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. J. Neurosci. Res. **69**: 946-54
- Sibley D.R., Monsma F.J.Jr., McVittie L.D., Gerfen C.R., Burch R.M. and Mahan L.C. (1992) Molecular neurobiology of dopamine receptor subtypes. Neurochem. Int. **20 Suppl.**: 17S-22S
- Siegel G.J. and Chauhan N.B. (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. Brain Res. Rev. **33**: 199-227
- Smith M.P., Fletcher-Turner A., Yurek D.M. and Cass W.A. (2006) Calcitriol protection against dopamine loss induced by intracerebroventricular administration of 6-Hydroxydopamine. Neurochem. Res. **31**: 533-9
- Somogy P. and Smith A.D. (1979) Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra: Application of a combined Golgi-staining and horseradish peroxidase transport procedure at both light and electron microscopic levels. Brain Res. **178**: 3-15
- Springer J.E., Mu X., Bergmann L.W. and Trojanowski J.Q. (1994) Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. Exp. Neurol. **127**: 167-70
- Stauton D.A., Wolfe B.B., Groves P.M. and Molinoff, P.B. (1981) Dopamine receptor changes following destruction of the nigrostriatal pathway: Lack of relationship to rotational behaviour. Brain Res. **211**: 315-327
- Sterner D.E. and Berger S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**: 435-59
- Strömberg I., Björklund L., Johansson M., Tomac A., Collins F., Olson L., Hoffer B. and Humpel C. (1993) Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo. Exp. Neurol. **124**: 401-12
- Stumpf W.E. and O'Brien L.P. (1987) 1,25(OH)₂ vitamin D₃ sites of action in the brain. Histochemistry **87**: 393-406

- Sudarsanam P. and Winston F. (2000) The Swi/Snf family nucleosomal-remodelling complexes and transcriptional control. Trends in Gen. **16**: 345-50
- Swanson L.W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde traces and immunofluorescence study in the rat. Brain Res. Bull. **9**: 321-53
- Szpirer J., Szpirer C., Riviere M., Levan G., Marynen P., Cassiman J.J. and Wiese R. DeLuca H.F. (1991) The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. Genomics. **11**: 168-73
- Tabner B.J., Turnbull S., El-Agnaf O. and Allsop D. (2001) Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and other neurodegenerative diseases. Curr. Top Med. Chem. **1**: 507-17
- Tagami T., Lutz W.H., Kumar R. and Jameson J.L. (1998) The interaction of the vitamin D receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators. Biochem. Biophys. Res. Commun. **253**: 358-63
- Takagi H., Somogy P., Somogy J. and Smith A.D. (1983) Fine structural studies on a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study. J. Comp. Neurol. **214**: 1-16
- Takahashi M. (2001) The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. Cytokine Growth Factor Rev. **12**: 361-73
- Tangpricha V., Flanagan J.N., Whitlatch L.W., Tseng C.C., Chen T.C., Holt P.R., Lipkin M.S. and Holick M.F. (2001) 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. Lancet **357**: 1673-74
- Thoenen H., Bade Y.A., Davies A.M. and Johnson J.E. (1987) Neurotrophic factors and neuronal death. Ciba Found. Symp. **126**: 82-95
- Tomac A., Lindqvist E., Lin L.F., Ogren S.O., Young D., Hoffer B.J., and Olson L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. Nature **373**: 335-39
- Towers T.L., Luisi B.F., Asianov A. and Freedman L.P. (1993) DNA target selectivity by the vitamin D₃ receptor: Mechanism of dimer binding to an asymmetric repeat element. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 6310-4
- Trono D. (2000) Lentiviral vectors: Turning a deadly foe into a therapeutic agent. Gene Ther. **7**: 20-23
- Trugman J.M. and James C.L. (1989) Rapid development of dopaminergic supersensitivity in reserpine-treated rats demonstrated with ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography. J. Neurosci. **12**: 2875-9

- Trupp M., Ryden M., Jornvall H., Funakoshi H., Timmusk T., Arenas E. and Ibáñez C.F. (1995) Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. J. Cell Biol. **130**: 137-48
- Trupp M., Scott R., Whittemore S.R. and Ibáñez C.F. (1999) Ret-dependent and independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signalling in neuronal cells. J.Biol.Chem. **274**: 20885-94
- Tseng J.L., Baetge E.E., Zurn A.D. and Aebischer P. (1997) GDNF reduces drug-induced rotational behaviour after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. J.Neurosci. **17**: 325-33
- Umesono K., Murakami K.K., Thompson C.C. and Evans R.M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. Cell. **65**: 1255-66
- Ungerstedt U. (1968) 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur. Pharmacol. **5**: 107-10
- Ungerstedt U. (1971a) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. Acta Physiol. Scand. **Supl. 367**: 69-93
- Ungerstedt U. (1971b) Histochemical studies on the effect of intracerebral injection of 6-hydroxydopamine on monoamine neurons in the rat brain. In T. Molmfors and H. Thoenen (eds.), 6-Hydroxydopamine and Catecholamine Neurons, Elsevier, Amsterdam, pp: 107-127
- Urnov F.D. and Wolffe A.P. (2001) Chromatin remodelling and transcriptional activation: The cast (in order of appearance). Oncogene **20**: 2991-3006
- Van Tol H.H., Bunzow J.R., Guan H.C., Sunahara R.K., Seeman P., Niznik H.B. and Civelli O. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. Nature **350**: 610-4
- Veenstra T.D., Londowski J.M., Windebank A.J., Brimijoin S. and Kumar R. (1997) Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth of mouse neuroblastoma cells. Brain Res. Dev. Brain Res. **99**: 53-60
- Veenstra T.D., Prüfer K., Koenigsberger C., Brimijoin S.W., Grande J.P., and Kumar R. (1998) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in the central nervous system of the rat embryo. Brain Res. **804**: 193-205
- Waddington J.L., Cross A.J., Longden A., Owen F. and Poulter M. (1979) Apomorphine-induced rotation in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat: relationship to changes in striatal adenylate cyclase activity and 3H-spiperone binding. Neuropharmacology. **18**: 643-5.

- Wagner K. and Trendelenburg U. (1971) Effect of 6-hydroxydopamine on oxidative phosphorylation and on monoamine oxidase activity. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **269**: 112-116
- Wang Y., Chiang Y.H., Su T.P., Hayashi T., Morales M., Hoffer B.J. and Lin S.Z. (2000) Vitamin D₃ attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats. Neuropharmacology **39**: 873-880
- Wang J.Y., Wu J.N., Cherng T.L., Hoffer B.J., Chen H.H., Borlongan C.V. and Wang Y. (2001) Vitamin D₃ attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. Brain Res. **904**: 67-75
- Welsh J., Witzke J.A., Zinser G.M., Snyczek S., Romu S., Tribble E., Welh J.C. and Bryne C.J. (2003) Impact of the vitamin D₃ receptor on growth-regularity pathways in mammary gland and breast cancer. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **83**: 85-92
- Wen Y.D., Perissi V., Staszewski L.M., Yang W.M., Krones A., Glass C.K., Rosenfeld M.G. and Seto E. (2000) The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 7202-07
- Wiese R.J., Uhland-Smith A., Ross T.K., Pahl J.M. and DeLuca H.F. (1992) Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. J. Biol. Chem. **267**: 20082-6.
- Winkler J.D. and Weiss B. (1989) Effect of continuous exposure to selective D1 and D2 dopaminergic agonists on rotational behavior in supersensitive mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. **249**: 507-16.
- Wong J., Li Q., Levi B-Z., Shi Y-B. and Wolffe A.P. (1997) Structural and functional features of a specific nucleosome containing a recognition element for the thyroid hormone receptor. EMBO J. **16**: 7130-45
- Wu J. and Grunstein M. (2000) 25 years after of nucleosome model: Chromatin modifications. Trends Biochem. Sci. **5**: 619-23
- Yan Q., Matheson C. and López O.T. (1995) In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. Nature **373**: 341-344
- Yao T.P., Ku G., Zhou N., Scully R. and Livingston D.M. (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 10626-31
- Yoh S.M. and Privalsky M.L. (2001) Transcriptional repression by thyroid hormone receptors. A role for receptor homodimers in the recruitment of SMRT corepressor. J. Biol. Chem. **276**: 16857-67
- Yuan H., Sarre S., Ebinger G. and Michotte Y. (2004) Neuroprotective and neurotrophic effect of apomorphine in the striatal 6-OHDA-lesion rat model of Parkinson's disease. Brain Res. **1026**: 95-107

- Yuen E.C. and Mobly W.C. (1996) Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurobiological disorders. Ann. Neurol. **40**: 346-54
- Zehnder D., Bland R., Williams M.C., McNinch R.W., Howie A.J., Stewart P.M. and Hewison M. (2001) Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. J. Clin. Endocrinol. Metab. **86**: 888-94
- Zhang W.Q., Tilson H.A., Nanry K.P., Hudson P.M., Hong J.S. and Stachowiak M.K. (1988) Increased dopamine release from striatal of rats after unilateral nigrostriatal bundle damage. Brain Res. **461**: 335-342

9. ABREVIATURAS

aa, aminoácido
AD, dominio de transactivación
ADN, ácido desoxirribonucleico
ADNc, ADN complementario
AF, función de activación
AD, aurícula derecha
AI, aurícula izquierda
AMPA, ácido α -amino-hidroxi-5-metil- 4-ixosazolepropiónico
AMPc, 3'5' adenosina monofosfato cíclico
AP, anteroposterior
Ara-C, citosina arabinósido
ARN, ácido ribonucleico
ARNasa, ribonucleasa
ARNm, ARN mensajero
ARTN, artemina
ATP, adenosina 5'-trifosfato
BDNF, factor neurotrófico derivado de la glia
CM, núcleo centromedial del tálamo
COMT, catecol-O-metiltransferasa
CREB, proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
EDTA, ácido etilendiaminotetracético
DA, dominio de activación
DAB, 3,3'-diaminobencidina
DBD, dominio de unión al ADN
DBP, proteína de unión a vitamina D
DEPC, dietilpirocarbonato
DIV, días en cultivo *in vitro*
DMEM, medio dulbecco mínimo esencial
DNasa, desoxirribonucleasa

dNTP, desoxirribonucleótido 5'-trifosfato
DTT, ditioneitol
EP, Enfermedad de Parkinson
ERH, elemento de respuesta hormonal
FBS, suero bovino fetal
GABA, ácido gamma-aminobutírico
GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDNF, factor neurotrófico derivado de la glia
GFAP, proteína fibrilar ácida glial
GFL, ligando de la familia de GDNF
GFR α , receptor α de la familia de GDNF
GH, hormona de crecimiento
GP, globo pálido
GPI, globo pálido lateral
GPI, glucosilfosfatidilinositol
GPm, globo pálido medial
HAT, histona acetiltransferasa
HDAC, inhibidores de la desacetilasa de histonas
HRE, elemento de respuesta hormonal
HS, suero de caballo
Ig, inmunoglobulina
IL, interleukina
i.p., intraperitoneal
KA, ácido kaínico
Kb, kilobases
kD, kilodalton
Kd, constante de disociación
LBD, dominio de unión al ligando
L-DOPA, 1-3,4-L-dihidroxifenilalanina

MAO, monoamina oxidasa

NMDA, N-metil-D-aspartato

MAPK, familia de kinasas asociadas a señales extracelulares mitógenas y de estrés

ML, mediolateral

MMLV-RT, Moloney murine leukemia virus retrotranscriptasa

MPP⁺, 1-metil-4-fenilpiridinio

MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridina

MTT, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio

NGF, factor de crecimiento neural

NRTN, neurturina

NST, núcleo subtalámico

NT, neurotrofina

6-OHDA, 6-hidroxidopamina

PAGE, electroforesis en geles de acrilamida

pb, pares de bases

PBS, tampón fosfato salino

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

PET, poliethilenimina

PLC, fosfolipasa C

PMA, área premotora de la corteza cerebral

PMSF, fluoruro de metilsulfonilfenilo

PR, receptor de progesterona

PSPN, persefina

PTH, hormona paratiroidea

Pu, purina

RAR, receptor del 9-trans-ácido retinoico

RE, receptor de estrógenos

RNasa, ribonucleasa

ROS, especies oxigénicas reactivas

RT, retrotranscripción

RXR, receptor de 9-cis ácido retinoico

SDS, dodecil sulfato sódico

SFK, kinasas de la familia Src citoplasmática

SMA, área motora suplementaria de la corteza cerebral

SN, sustancia negra

SNC, sistema nervioso central

Snc, parte compacta de la sustancia nigra

SNr, parte reticular de la sustancia nigra

T₃, triyodotironina

Taq DNA polimerasa, ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

TEMED, N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina

TGF-β, factor de crecimiento transformante β

TH, tirosina hidroxilasa

TR, receptor de hormonas tiroideas

VA, núcleo ventral anterior del tálamo

VD, ventrículo derecho

VDR, receptor de vitamina D

VDRm, Receptor de vitamina D de membrana

VDRE, elemento de respuesta a vitamina D

VI, ventrículo izquierdo

VIH, virus de inmunodeficiencia humana

VL, núcleo ventrolateral del tálamo

VM, núcleo ventromedial del tálamo

VTa, área tegmental ventral

